

Interventionsmöglichkeiten von
Inkretinmimetika in den
Pathogeneseprozess der pulmonalen
Hypertonie sowie daraus abgeleitete
potenzielle therapeutische
Konsequenzen

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Maximilian Hertl
aus Hadamar

Gießen 2017

Aus dem Excellence Cluster CardioPulmonary System (ECCPS)
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Direktor: Prof. Dr. med. Werner Seeger

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Ralph Theo Schermuly

Gutachter: Prof. Dr. med. Robert Voswinckel

Tag der Disputation: 07. März 2018

Für 11. 05.

You Know Who You Are ...

Studierzimmer

Mephistopheles.

Gebraucht der Zeit, sie geht so schnell von hinnen,
Doch Ordnung lehrt Euch Zeit gewinnen.
Mein teurer Freund, ich rat Euch drum
Zuerst *Collegium Logicum*.
Da wird der Geist Euch wohl dressiert,
In spanische Stiefeln eingeschnürt,
Dass er bedächtiger so fortan
Hinschleiche die Gedankenbahn,
Und nicht etwa, die Kreuz und Quer
Irrlichteliere hin und her.

[...]

Zwar ist's mit der Gedankenfabrik
Wie mit einem Weber-Meisterstück.
Wo ein Tritt tausend Fäden regt,
Die Schifflein herüber hinüber schießen,
Die Fäden ungesehen fließen,
Ein Schlag tausend Verbindungen schlägt.
Der Philosoph, der tritt herein
Und beweist Euch, es müsst so sein:
Das Erst wär so, das Zweite so,
Und drum das Dritt und Vierte so;
Und wenn das Erst und Zweit nicht wär,
Das Dritt und Viert wär nimmermehr.
Das preisen die Schüler allerorten,
Sind aber keine Weber geworden.
Wer will was Lebendigs erkennen und beschreiben,
Sucht erst den Geist herauszutreiben,
Dann hat er die Teile in seiner Hand,
Fehlt leider! nur das geistige Band.

[...]

Schüler.

Mir wird von alledem so dumm,
Als ging' mir ein Mühlrad im Kopf herum.

[Aus: Johann Wolfgang von Goethe: Faust. Der Tragödie Erster Teil. Zitiert nach der Schöningh-Ausgabe, Johannes Diekhans (Hrsg), Paderborn 2007. Verse 1908 - 1947]

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	01
1.1	Einführung in die Thematik	01
1.1.1	Anatomie & Physiologie des Respirationstraktes	01
1.1.2	Vaskuläre Besonderheiten der Lungenstrombahn	08
1.2	Pulmonale Hypertonie	11
1.2.1	Definition	11
1.2.2	Epidemiologie	12
1.2.3	Klinische Klassifikation	12
1.2.4	Pathogenese	14
1.2.5	Tiermodelle der PH	18
1.2.6	Klinik & Diagnostik	19
1.2.7	Therapie	22
1.3	Das Inkretinhormon <i>glucagon-like peptide 1</i>	25
1.3.1	Physiologische Funktion der Inkretine im Gastrointestinaltrakt	25
1.3.2	Die Anwendung von Inkretinanaloga & DPP-IV-Inhibitoren in der Therapie des Typ-II-Diabetes mellitus	28
1.3.3	Die Entdeckung eines erweiterten Wirkspektrums von GLP-1	29
1.3.4	Der GLP-1 Rezeptor	34
1.4	Zielsetzung dieser Arbeit	36
2	MATERIAL UND METHODEN	37
2.1	Material	37
2.1.1	Labortechnische Apparaturen & Instrumente	37
2.1.2	Chemikalien, Reagenzien & Substanzen	38
2.1.3	Verbrauchsmaterialien	40
2.1.4	Puffer, Medien & Lösungen	41
2.1.5	Verwendete Antikörper für die Immunhistochemie	42
2.1.6	Kits & Assays	42
2.1.7	Computerprogramme	42

2.1.8 Probenmaterial	43
2.2 Methoden	45
2.2.1 Herstellung eines histologischen Präparates	45
2.2.2 Konventionelle histologische Färbungen	45
2.2.3 Immunhistochemische Färbungen	47
2.2.4 Quantifizierung der Immunhistochemie: <i>Scoring analysis</i>	51
2.2.5 Zellkultur	51
2.2.6 Statistische Auswertung	52
3 ERGEBNISSE	53
3.1 Lokalisation von <i>glucagon-like peptide 1 receptor</i> (GLP-1R) auf pulmonalvaskulären Strukturen	53
3.1.1 Lokalisation von GLP-1R in Humanlungen	53
3.1.2 Lokalisation von GLP-1R in Rattenlungen	54
3.2 Expressionsprofil von GLP-1R	55
3.2.1 Humanlungen: Donor vs. IPAH	56
3.2.2 Humanlungen: Donor vs. CTEPH	57
3.2.3 Rattenlungen: <i>Healthy control</i> vs. MCT	58
3.3 Expressionsprofil von GLP-1	59
3.3.1 Humanlungen: Donor vs. IPAH	59
3.3.2 Humanlungen: Donor vs. CTEPH	60
3.3.3 Rattenlungen: <i>Healthy control</i> vs. MCT	61
3.4 Zellkultur	62
4 DISKUSSION	64
4.1 Immunhistochemische Untersuchungen	64
4.1.1 Lokalisationsbestimmung von GLP-1R	64
4.1.2 Expressionsprofil von GLP-1 & GLP-1R	64
4.1.3 <i>Scoring analysis</i>	65
4.2 Zellkultur	66
4.3 Implikationen für eine Therapie der PH mit GLP-1 Analoga	66
4.4 Fazit & klinische Perspektive	72

5	ZUSAMMENFASSUNG	73
6	SUMMARY	74
7	ANHANG	75
8	LITERATURVERZEICHNIS	81
9	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	104
10	TABELLENVERZEICHNIS	106
11	DANKSAGUNG	107
12	LEBENS LAUF	108
13	EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG	109

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Chemische (Summen-)formeln & Elementsymbole

Ca^{2+}	Calcium, ionisiert
CO_2	Kohlenstoffdioxid
dH_2O	destilliertes Wasser
Fe	<i>Ferrum</i> - Eisen
HCl	Chlorwasserstoff (Salzsäure)
H_2O	Wasser
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
K^+	Kalium, ionisiert
KCl	Kaliumchlorid
KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat
Na^+	Natrium, ionisiert
NaCl	Natriumchlorid (Kochsalz)
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat
NaN_3	Natriumazid
NaOH	Natriumhydroxid (Natronlauge)
$-\text{NH}_2$	Aminogruppe (-amid)
NO	Stickstoffmonoxid
O_2	<i>Oxygenium</i> - Sauerstoff
pCO_2	Kohlenstoffdioxidpartialdruck
pO_2	Sauerstoffpartialdruck

Formelzeichen & Symbole

\uparrow	erhöht
\sim	etwa, ungefähr; entspricht
$^\circ$	Grad
\geq	größer gleich
$<$	kleiner als
\leq	kleiner gleich
\pm	plus/minus

%	Prozent
&	und
↓	vermindert
n	Anzahl
p	Signifikanzwert
x	-fach/mal

Griechisches Alphabet

α	<i>Alpha</i>
β	<i>Beta</i>
γ	<i>Gamma</i>
δ	<i>Delta</i>
Δ	<i>Delta</i> (Differenz)
κ	<i>Kappa</i>
λ	<i>Lambda</i> (Wellenlänge)
μ	<i>My</i> (Mikro, 10^{-6})
π	<i>Pi</i> (Kreiszahl: 3,14...)
Σ	<i>Sigma</i> (Summe)

Einheiten

°C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
g	Gramm
h	<i>hour</i> - Stunde
L	Liter
m	Milli (10^{-3})
min	Minute
ml	Milliliter
m ²	Quadratmeter
mm	Millimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule

mm ²	Quadratmillimeter
mM	Millimolar
M	Molar (Mol pro Liter)
μL	Mikroliter
μm	Mikrometer
μm ²	Quadratmikrometer
μM	Mikromolar
ms	Millisekunde
n	Nano (10 ⁻⁹)
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
p	Piko (10 ⁻¹²)
pH	<i>potentia hydrogenii</i> - negativer dekadischer Logarithmus der H ₃ O ⁺ -Konzentration
pmol	Pikomol
sec	<i>second</i> - Sekunde

Die Erläuterungen zu den in dieser Arbeit verwendeten mathematischen Formeln finden sich als Legende direkt unter der jeweiligen Formel.

Geläufige Abkürzungen

A.	<i>arteria</i> - Arterie
a.e.	am ehesten
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
ca.	<i>circa</i> - um ... herum
d.h.	das heißt
et al.	<i>et alteri</i> - und andere
etc.	<i>et cetera</i> - und die übrigen Dinge
geb.	geborene
ggf.	gegebenenfalls
Hrsg	Herausgeber
i.d.R.	in der Regel
inkl.	inklusive

lfd.	laufend
N.	<i>nervus</i> - Nerv
Nr.	Nummer
o.g.	oben genannte
R.	<i>ramus</i> - Ast
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
sog.	sogenannt
u.a.	unter anderem
u.U.	unter Umständen
V.	<i>vena</i> - Vene
v.a.	vor allem
vgl.	vergleiche
vs.	<i>versus</i> - gegen(über)
Vv.	<i>venae</i> - Venen
WS	Wintersemester
z.B.	zum Beispiel
Z.n.	Zustand nach

Wissenschaftliche Termini

5-HT	5-Hydroxytryptamin (~ Serotonin)
AC	<i>adenylate cyclase</i> - Adenylatzyklase
ACh	Acetylcholin
ADH	antidiuretisches Hormon (~ Vasopressin)
AGEs	<i>advanced glycation end products</i> - Endprodukte fortgeschrittener Glykierung
Ak	Antikörper
Akt	Proteinkinase B (PKB)
ALK-1	<i>activin receptor-like kinase-1</i> - aktivinrezeptor-ähnliche Kinase-1
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
ANP	atriales natriuretisches Peptid
AP	alkalische Phosphatase
ATP	Adenosintriphosphat
BMP	<i>bone morphogenetic protein</i> - knochenmorphogenetisches Protein

BMPR2	<i>bone morphogenic protein receptor type 2</i> - knochenmorphogenetischer Proteinrezeptor 2
BNP	<i>brain natriuretic Peptide</i> - B-natriuretisches Peptid
BPA	<i>balloon pulmonary angioplasty</i> - pulmonale Ballonangioplastie
BrdU	5-Brom-2'-Desoxyuridin
BSA	bovines Serumalbumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CAV1	Caveolin-1
CD	<i>cluster of differentiation</i> - Differenzierungscluster
CD11b	Integrin <i>alpha</i> M (ITGAM)
CD20	Ca ²⁺ -Kanal formendes Transmembranprotein auf B-Zellen
CD26	Dipeptidylpeptidase-IV (DPP-IV)
CD36	<i>fatty acid translocase (FAT)</i> - Fettsäure-Translokase
CM	<i>cardiomyopathy</i> - Kardiomyopathie
COPD	<i>chronic obstructive pulmonary disease</i> - chronisch obstruktive Lungenerkrankung
COX	Cyclooxygenase
CRP	C-reaktives Protein
CTEPH	chronisch thromboembolische pulmonale Hypertonie
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> - Desoxyribonukleinsäure
DPP-IV	Dipeptidylpeptidase-IV
DURATION	<i>Diabetes therapy Utilization: Researching changes in A_{1C}, weight and other factors Through Intervention with exenatide ONce weekly</i> - Nutzung von Diabetes Therapien: Erforschung der Veränderungen von HbA _{1c} , Gewicht und anderen Faktoren durch Intervention mit Exenatid einmal wöchentlich
ECCPS	<i>Excellence Cluster "CardioPulmonary System"</i> - Exzellenzcluster "kardiopulmonales System"
ECE	<i>endothelin converting enzyme</i> - Endothelin konvertierendes Enzym
EGF	<i>epidermal growth factor</i> - epidermaler Wachstumsfaktor
EKG	Elektrokardiogramm
ENG	Endoglin
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase

Epac2	<i>exchange protein directly activated by cAMP 2</i> - direkt durch cAMP aktiviertes Austausch-Protein 2
ET-1	Endothelin-1
ET-A	Endothelin-Rezeptorisoform A
ET-B	Endothelin-Rezeptorisoform B
EvG	Elastica-van-Gieson
EZM	extrazelluläre Matrix
FCS	<i>fetal calf serum</i> - fetales Kälberserum
FFPE	<i>formalin-fixed, paraffin-embedded</i> - Formalin-fixiert und Paraffin-eingebettet
FGF	<i>fibroblast growth factor</i> - Fibroblastenwachstumsfaktor
G α_s	stimulierendes G-Protein mit cAMP-abhängiger Reaktion
G α_i	inhibitorisches G-Protein
G α_q	PLC-gekoppeltes G-Protein
G α_0	inhibitorisches G-Protein
gER	glattes Endoplasmatisches Retikulum
GIP	glucoseabhängiges insulinotropes Peptid
GLP-1	<i>glucagon-like peptide 1</i> - Glucagon-ähnliches Peptid 1
GLP-1R	<i>glucagon-like peptide 1 receptor</i> - Rezeptor des Glucagon-ähnlichen Peptids 1
GMP	Guanosinmonophosphat
GRP	<i>gastrin-releasing peptide</i> - gastrinfreisetzendes Peptid
GSK-3 β	Glykogen Synthase Kinase-3 β
HbA _{1c}	Anteil des nichtenzymatisch mittels Amadori-Umlagerung glykierten Hämoglobins am Gesamthämoglobin in %
HDL	<i>high density lipoprotein</i> - Lipoprotein hoher Dichte
HE	Hämatoxylin-Eosin
HGF	<i>hepatocyte growth factor</i> - Hepatocytenwachstumsfaktor
HIF-1 α	Hypoxie-induzierbarer Faktor-1 α
HIV	humanes Immundefizienz-Virus
HPV	hypoxische pulmonale Vasokonstriktion
HUVECs	<i>human umbilical vein endothelial cells</i> - Endothelzellen aus der menschlichen Nabelschnurvene
HWZ	Halbwertszeit
HZV	Herzeitvolumen

ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule-1</i> - interzelluläres Adhäsionsmolekül-1
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-6	Interleukin-6
ILD	<i>interstitial lung disease</i> - interstitielle Lungenerkrankung
IPAH	idiopathische pulmonalarterielle Hypertonie
KCNK3	<i>two-pore-domain Potassium (K^+) channel 3</i> - zwei-Poren Kalium (K^+) Kanal 3
L-	linksdrehendes Enantiomer der organischen Verbindung
LEAD	<i>Liraglutide Effect and Action in Diabetes</i> - Effekt von Liraglutid und dessen Wirkung bei Diabetes
LDL	<i>low density lipoprotein</i> - Lipoprotein niederer Dichte
LH	luteinisierendes Hormon (~ Lutropin)
LKB1	Leber-Kinase B1
LPS	Lipopolysaccharid
LVEF	<i>left ventricular ejection fraction</i> - linksventrikuläre Auswurffrac-tion
MAP-K	mitogen-aktivierte Protein-Kinase
MCP-1	<i>monocyte chemoattractant protein-1</i> - Monocyten chemisch anziehendes Protein-1
MCT	Monocrotalin
MI	Myokardinfarkt
MMP	Matrix-Metalloprotease
mPAP	<i>mean pulmonary arterial pressure</i> - pulmonalarterieller Mitteldruck
MRT	Magnetresonanztomographie
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NASH	nicht-alkoholische Steatohepatitis
NF- κ B	nukleärer Faktor- κ B
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
NYHA	<i>New York Heart Association</i> - New Yorker Herzvereinigung
PAH	<i>pulmonary arterial hypertension</i> - pulmonalarterielle Hypertonie
PAI-1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1
PAP	<i>pulmonary arterial pressure</i> - pulmonalarterieller Druck
PASMCs	<i>pulmonary artery smooth muscle cells</i> - pulmonalarterielle glatte Muskelzellen

PBS	<i>phosphate buffered saline</i> - phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCH	<i>pulmonary capillary hemangiomatosis</i> - pulmonalkapilläre Hämangiomatose
PDE	Phosphodiesterase
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i> - Thrombozyten-abstammender Wachstumsfaktor
PEA	pulmonale Thrombendarteriektomie
PGI ₂	Prostaglandin I ₂ (~ Protazyklin)
PH	pulmonale Hypertonie
PI3-K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PIGF	<i>placental growth factor</i> - plazentarer Wachstumsfaktor
PPAR γ	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor γ
PPH	primäre pulmonale Hypertonie (Synonym zu IPAH; alter Begriff)
PPHN	persistierende pulmonalarterielle Hypertonie des Neugeborenen
P/S	Penicillin/Streptomycin
PVOD	<i>pulmonary veno-occlusive disease</i> - pulmonale venookklusive Erkrankung
PVR	<i>pulmonary vascular resistance</i> - pulmonalvaskulärer Widerstand
rER	raues Endoplasmatisches Retikulum
RNA	<i>ribonucleic acid</i> - Ribonukleinsäure
RNS	<i>reactive nitrogen species</i> - reaktive Stickstoffspezies
ROS	<i>reactive oxygen species</i> - reaktive Sauerstoffspezies
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinasen
RV	rechter Ventrikel, rechtsventrikulär
SAS	Schlafapnoe-Syndrom
SEM	<i>standard error of the mean</i> - Standardfehler
sFlt-1	<i>soluble fms-like tyrosine kinase-1</i> - lösliche fms-ähnliche Tyrosinkinase-1 (~ löslicher VEGF-Rezeptor-1)
sGC	<i>soluble guanylate cyclase</i> - lösliche Guanylatzyklase
SMAD9	Kunstwort aus dem Gen für das Protein Sma (<i>small body size</i>) des Fadenwurms <i>Caenorhabditis elegans</i> und dem homologen Gen MAD (<i>mothers against decapentaplegic</i>) der Taufliege <i>Drosophila melanogaster</i>

T2DM	Typ-II-Diabetes mellitus
TBS	<i>tris-buffered saline</i> - Tris(hydroxymethyl)-aminomethan gepufferte Kochsalzlösung
TGF- β	<i>transforming growth factor</i> - β - transformierender Wachstumsfaktor- β
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TRPC	<i>transient receptor potential channel</i> - rezeptoraktivierte Kationenkanäle
TSH	Thyroidea-stimulierendes Hormon (~ Thyreotropin)
TTE	transthorakale Echokardiographie
TXA ₂	Thromboxan A ₂
VCAM-1	<i>vascular cell adhesion molecule</i> -1 - vaskuläres Zell- Adhäsionsmolekül-1
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i> - vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
vWF	von-Willebrand-Faktor
ZNS	Zentralnervensystem

1 EINLEITUNG

1.1 Einführung in die Thematik

1.1.1 Anatomie & Physiologie des Respirationstraktes

Topographie

Die Lunge (*Pulmo*) liegt als zentrales Atmungsorgan in der Brusthöhle (*Cavitas thoracis*) des Menschen (1). Sie besteht aus je einem rechten und einem linken Lungenflügel (*Pulmo dexter et sinister*), welche das Herz (*Cor*) umschließen (1). Weitere angrenzende Strukturen sind medial der Mittelfellraum (*Mediastinum*), kaudal das Zwerchfell (*Diaphragma*) sowie ventrolaterodorsal die Innenseite des Brustkorbes (*Thorax*) (1). Nach kranial ragt die Pleurakuppel (*Cupula pleurae*) bis zu 5 cm über die obere Thoraxapertur (*Apertura thoracis superior*) hinaus (2).

Lungenhilus und Pleuraverhältnisse

Alle in das Lungenparenchym ein- und austretenden Strukturen (inkl. Nerven und Lymphgefäßen) sind gebündelt an der mediastinal gelegenen Lungenpforte (*Hilus pulmonis*) lokalisiert; hier findet zudem auch die Verschmelzung der beiden Pleurablätter statt (3): Das Rippenfell (*Pleura parietalis*) bildet die innere Auskleidung der Thoraxwand, das Lungenfell (*Pleura visceralis*) liegt direkt dem Lungenparenchym an und stellt somit die oberflächliche Begrenzung der Lunge dar (3). Die Pleurablätter sind zusammen mit der durch sie sezernierten serösen Pleuraflüssigkeit im Pleuraspalt für die Atemmechanik von entscheidender Bedeutung (4).

Makroskopische Lappen- und Segmenteinteilung

Der linke Lungenflügel besteht aus zwei Lungenlappen (*Lobi pulmones*); der rechte hingegen aus drei (1). Die Trennung der einzelnen Lappen erfolgt durch Furchen (*Fissurae*) (1). Die schräge Furche (*Fissura obliqua*) teilt den linken Lungenflügel in Ober- und Unterlappen; den rechten hingegen in Unter- und Mittellappen; die Abgrenzung des nur rechts vorhandenen Mittellappens zum Oberlappen erfolgt durch die horizontale Fissur (*Fissura horizontalis*) (1). Die Lappen wiederum sind in Segmente unterteilt (1). Die rechte Lunge besteht aus 10 Segmenten; die linke lediglich aus 9; hier fehlt das Segment 7 (sog. Herzsegment, *Segmentum basale mediale*) (1).

Ventilation und Perfusion

Entsprechend der Hauptaufgabe der Lunge - der Anreicherung des vom rechten Herzen stammenden sauerstoffarmen Blutes mit Sauerstoff - muss die Lunge sowohl über ein luftleitendes System (*Ventilation*) als auch über ein blutleitendes System (*Perfusion*) verfügen (5).

Ventilation

Zu den extrathorakal gelegenen an der Ventilation beteiligten Abschnitten zählen Nasenhöhle (*Cavitas nasi*) bzw. Mundhöhle (*Cavum oris*) und deren Vereinigung im Rachen (*Pharynx*) sowie nachfolgend Kehlkopf (*Larynx*) und der kraniale Teil der Luftröhre (*Trachea*) (2). Der kaudale Teil der Trachea mit sich daran anschließendem Bronchialbaum (*Arbor bronchialis*) ist bereits intrathorakal lokalisiert (2). Die Trachea teilt sich an der Trachealbifurkation (*Bifurcatio tracheae*, klinisch *Carina*) zunächst in rechten und linken Hauptbronchus (*Bronchus principalis dexter et sinister*) zur Versorgung der beiden Lungenflügel (2). Die Hauptbronchien wiederum teilen sich entsprechend den jeweiligen Lungenlappen in 2 (links) bzw. 3 (rechts) Lappenbronchien (*Bronchi lobares*) (2). Die in der Systematik des Bronchialbaumes darauffolgenden Segmentbronchien (*Bronchi segmentales*) stellen das Äquivalent zu der Segmenteinteilung der Lungenlappen dar; ein Segmentbronchus versorgt demnach je ein Lungensegment (2). Als weitere Teilungsgenerationen folgen Subsegmentbronchus, Bronchiolus und Bronchiolus terminalis, bevor nach ca. 16 Teilungsgenerationen mit dem Bronchiolus respiratorius erstmals ein Alveolarbesatz auftritt (5). Zählen noch alle dem Bronchiolus respiratorius vorgeschalteten Abschnitte zum rein luftleitenden (konduktiven) System (analog der Definition des ca. 150 ml fassenden anatomischen Totraums der Lunge), so ist distal dieser Grenze Gasaustausch prinzipiell möglich (5). Dem Bronchiolus respiratorius schließen sich die Alveolargänge (*Ductuli alveolares*) und Alveolarsäckchen (*Sacculi alveolares*) an (5).

Der Lungenazinus (*Acinus pulmonis*) ist definiert als die Gesamtheit der von einem Bronchiolus terminalis versorgten Abschnitte (2). Somit besitzen alle Komponenten eines Azinus Lungenbläschen (*Alveolen*) und werden daher zum gasaustauschenden Abschnitt der Atemwege gezählt (2). Der Mensch besitzt zwischen 300 und 400 Millionen Alveolen mit einer Größe von inspiratorisch durchschnittlich 200 - 300 µm (6). Der Azinus bildet die funktionelle Einheit der Lunge (2).

Perfusion

Die Perfusion der Lunge erfolgt durch den der rechten Herzkammer (*Ventriculus dexter cordis*) entspringenden Lungenarterienstamm (*Truncus pulmonalis*) (7). Im Mediastinum teilt sich der Truncus in die rechte und linke Pulmonalarterie (*A. pulmonalis dextra et sinistra*) (7). Die Arterien treten am Lungenhilus in den jeweiligen Lungenflügel ein (7). Intrapulmonal verzweigen sich die beiden Pulmonalarterien unmittelbar parallel zu den luftleitenden Wegen, sodass Bronchus und jeweils korrespondierender Ast der *A. pulmonalis* eine Einheit bilden (2). Schließlich endet die Strombahn der *A. pulmonalis* auf Alveolarniveau als perialveoläres fein verzweigtes Kapillarnetz (8). Zwischen den Lungenkapillaren und dem Alveolarepithel findet der Gasaustausch statt (6).

Der Gasaustausch

Der Gasaustausch erfolgt mittels Diffusion (**Abbildung 1**) (6). Demnach gilt das Fick'sche Diffusionsgesetz, welches wie folgt lautet (9):

$$V = \frac{(P_1 - P_2) \times A}{d} \times D$$

mit V = Diffusionsstrom, P₁ = Partialdruck des Gases im Alveolarraum, P₂ = Partialdruck des Gases in den Kapillaren, A = Austauschfläche, d = Dicke der Alveolar-membran, D = gasabhängiger Diffusionskoeffizient.

Sauerstoff (O₂) diffundiert passiv entlang seines Diffusionsgradienten von der Alveole in das Blut der Kapillare (pO₂ alveolär ~ 100 mmHg; pO₂ kapillär ~ 40 mmHg) und Kohlenstoffdioxid (CO₂) diffundiert umgekehrt vom Kapillarblut in die Alveole (pCO₂ kapillär ~ 46 mmHg; pCO₂ alveolär ~ 40 mmHg) (8). Die Diffusionsbarriere (Blut-Luft-Schranke) ist hierbei mit im Mittel 2,0 µm sehr dünn und weist eine Dreischichtung auf (6): Sie besteht aus dem Kapillarendothel, dem Alveolarepithel (*Pneumocyten Typ I*) und einer gemeinsamen Basalmembran (6). Eine weitere Vereinfachung der Diffusion ist durch die extrem große Austauschfläche gegeben (6). Berücksichtigt man den normalen Alveolardurchmesser in Kombination mit der normalen Alveolenanzahl, so ergibt sich eine Fläche von rund 80 - 140 m² (6). Die unterschiedlichen Partialdruck-differenzen von O₂ und CO₂ werden durch den etwa 23-fach höheren Diffusionskoeffizienten für CO₂ ausgeglichen (8).

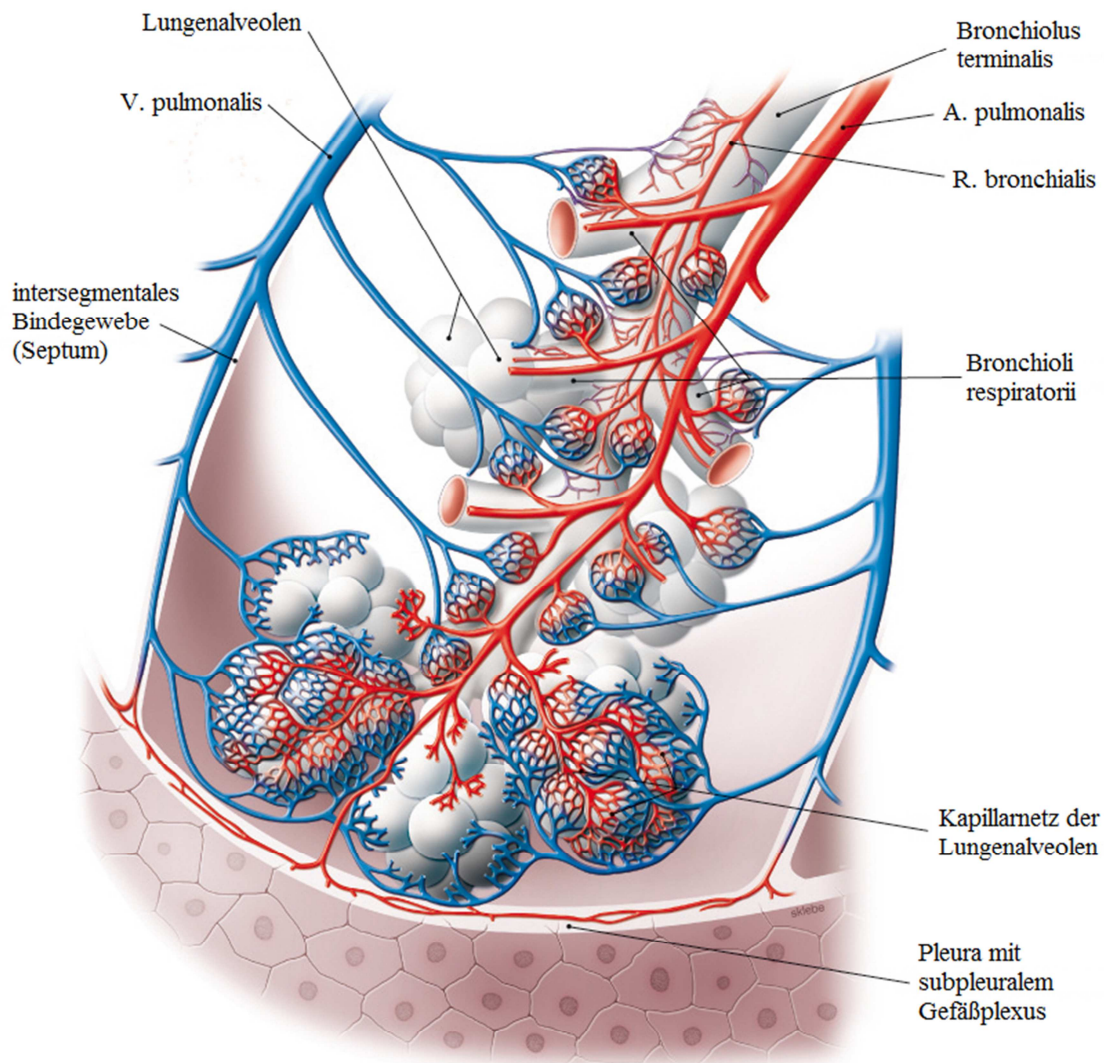


Abbildung 1: Funktionelle Anatomie der Lunge: Alveoläres Kompartiment.

Der Lungenacinus (*Acinus pulmonis*) besteht aus einem Bronchiolus terminalis und den dazugehörigen Alveolen sowie deren Blutversorgung. Im alveolären Kompartiment findet der Gasaustausch statt: Sauerstoff diffundiert entsprechend seines Partialdruckgradienten von der eingeatmeten Luft in das Blut und Kohlenstoffdioxid analog vom Blut in die Alveole, von wo aus es abgeatmet wird. Übernommen aus Paulsen und Waschke [Hrsg] (2).

Der Blutkreislauf des Menschen ist geschlossen

Postkapilläre Venolen, welche jetzt sauerstoffreiches (arterialisiertes) Blut führen, vereinigen sich im weiteren Verlauf zu Venen (7). Die Venen jedoch verlaufen nicht peribronchial, sondern im intersegmentalen Bindegewebe an den Lungensegmentgrenzen (7). Üblicherweise verlassen pro Lungenhilus 2 Lungenvenen (*Vv. pulmonales*) die Lunge und treten in den linken Vorhof des Herzens (*Atrium sinistrum cordis*) ein (7).

Vom linken Vorhof gelangt das Blut über die Mitralklappe (*Valva atrioventricularis sinistra*) in die linke Herzkammer (*Ventriculus sinister cordis*), von wo aus es in der Systole durch die Aortenklappe (*Valva aortae*) in die Hauptschlagader (*Aorta*) und somit in den Körperkreislauf gepumpt wird (7). Die Äste der Aorta transportieren das sauerstoffreiche Blut über multiple Aufzweigungen zu allen peripheren Geweben (7). In den terminalen Abschnitten der Strombahn (Kapillarnetz) wird der Sauerstoff verbraucht und das Blut mit Kohlenstoffdioxid aus dem Gewebe angereichert (9). Dies geschieht ebenfalls passiv anhand des dort vorherrschenden Partialdruckgradienten durch Diffusion (9). Die Venen, die sich nach der Passage des Kapillarnetzes bilden, führen folglich sauerstoffarmes Blut (9). Dieses gelangt über die obere und untere Hohlvene (*V. cava superior et inferior*) zum rechten Vorhof des Herzens (*Atrium dextrum cordis*) und über die Trikuspidalklappe (*Valva atrioventricularis dextra*) in die rechte Herzkammer (7). Das sauerstoffarme Blut verlässt das rechte Herz durch die Pulmonalklappe (*Valva trunci pulmonalis*) über den Truncus pulmonalis, um in der Lunge erneut mit Sauerstoff angereichert zu werden (7). Der Kreislauf ist geschlossen (7).

Da bei der pulmonalen Hypertonie (PH) als Erkrankung des kardiopulmonalen Systems das Herz konsekutiv mitbetroffen ist (10), ist es durchaus sinnvoll, die o.g. Kreislaufverhältnisse visuell zu rekapitulieren (**Abbildung 2**). Diese Kreislaufsystematik repräsentiert die sog. öffentlichen Gefäße der Lunge (*Vasa publica*) (1). Nicht näher eingegangen werden soll an dieser Stelle auf die doppelte Gefäßversorgung der Lunge (*Vasa privata*) (1).

Allgemeine Systematik der Blutgefäße

Prinzipiell weisen Blutgefäße einen identischen dreischichtigen Aufbau (**Abbildung 3**) auf (6): Die an die Lichtung (*Lumen*) grenzende Tunica interna besteht aus einer einzelnen Schicht Endothelzellen sowie spärlichem subendotheliale Bindegewebe (*Lamina propria intima*) (6). Die Tunica media hingegen besteht je nach Gefäßtyp zu unterschiedlichen Anteilen aus elastischen und glattmuskulären Elementen (6): In herznahen Arterien vom elastischen Typ überwiegt der elastische Anteil in Form von elastischen Membranen und Fasern, während in herzfernen Arterien vom muskulären Typ das Verhältnis deutlich zugunsten der glatten Muskelzellen verschoben ist (6). Die Tunica adventitia besteht hauptsächlich aus Bindegewebe und dient der Integration des Gefäßes in seine physiologische Umgebung (6). Bei größeren Gefäßen finden sich hier auch die Gefäße der Gefäße (*Vasa vasorum*) sowie deren vegetative Innervation (6).

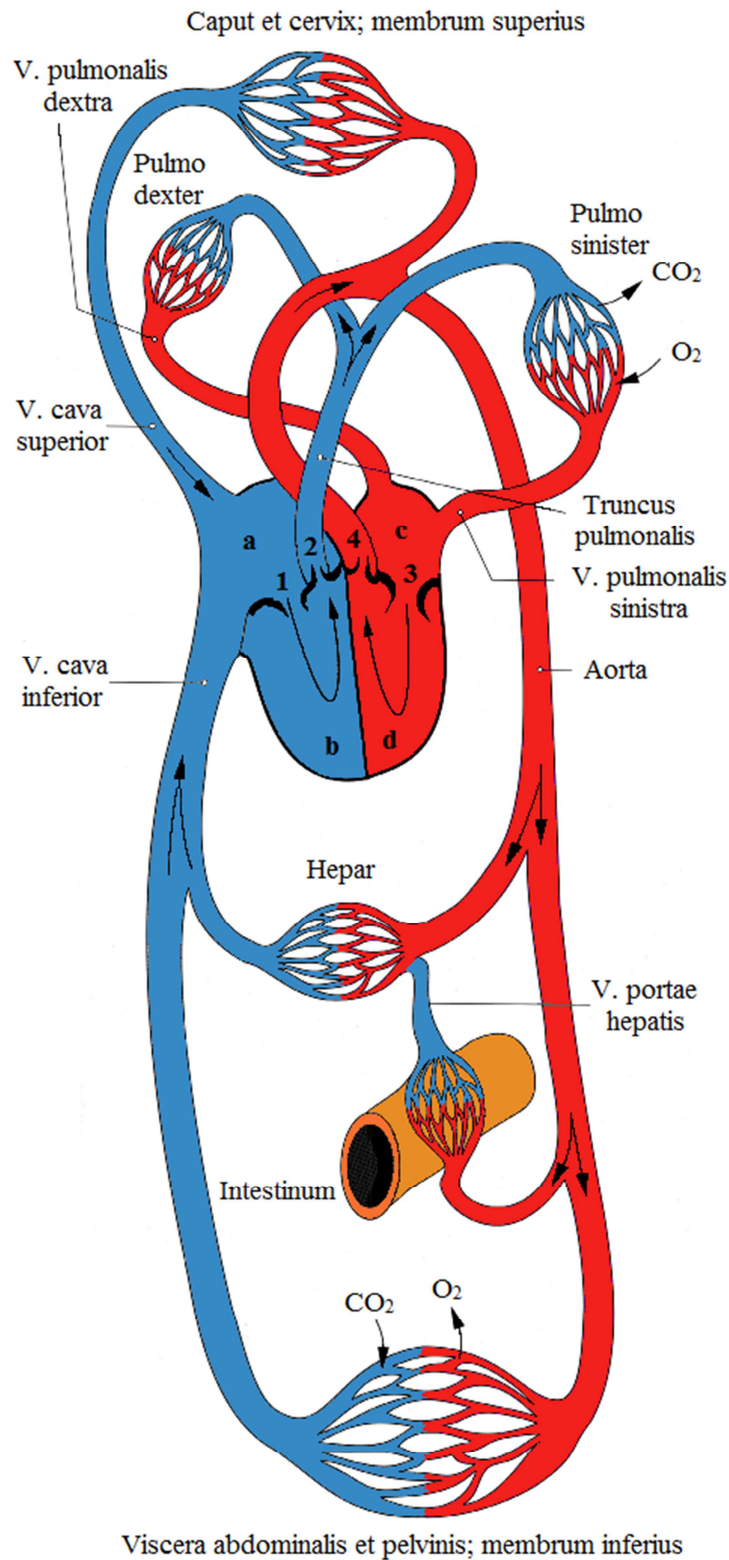


Abbildung 2: Stark vereinfachtes Schema des kardiovaskulären Systems.

a Rechter Vorhof (*Atrium dextrum*); **b** Rechte Kammer (*Ventriculus dexter*); **c** Linker Vorhof (*Atrium sinister*); **d** Linke Kammer (*Ventriculus sinister*). **1** Trikuspidalklappe (*Valva atrioventricularis dextra*); **2** Pulmonalklappe (*Valva trunci pulmonalis*); **3** Mitralklappe (*Valva atrioventricularis sinistra*); **4** Aortenklappe (*Valva aortae*). **Rot** sauerstoffreiches Blut; **Blau** sauerstoffarmes Blut. Die **Pfeile** geben die Flussrichtung des Blutes an. Modifiziert nach Schiebler und Korf (1).

Wenngleich sowohl Arterien als auch Venen prinzipiell einen identischen Wandaufbau zeigen, so ist dieser jedoch im arteriellen Gefäßsystem i.d.R. besser zu differenzieren als in venösen Gefäßen; ein Umstand, welcher insbesondere für die Abgrenzung der beiden elastischen Membranen gilt (6). Mit der Annäherung des arteriellen Systems an die Anteile der terminalen Strombahn (bestehend aus Arteriolen, Kapillaren und Venolen) geht der klassische dreischichtige Aufbau zunehmend verloren (6). So bestehen Kapillaren lediglich aus einer Schicht Endothelzellen und deren Basalmembran sowie vereinzelt Bindegewebszellen mit Stabilisierungsfunktion (*Pericyten*) (11). Die dadurch gewährleistete sehr geringe Wandstärke der Kapillaren von ca. 1 μm ermöglicht einen effizienten Gasaustausch durch eine maximale Verkürzung der Diffusionsstrecke (s.o.) (8).

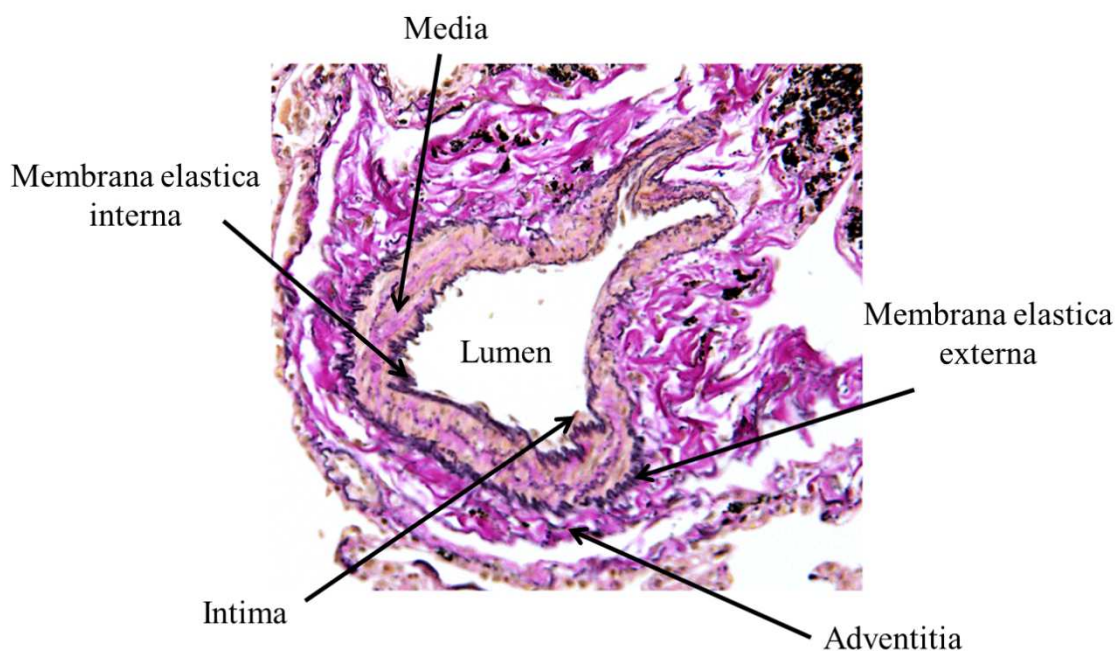


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Aufbaus einer Arterie.

Arterien - wie Blutgefäße allgemein - bestehen prinzipiell aus 3 Schichten: Tunica interna (*Intima*, *Endothelium*), Tunica media (*Media*, *Muscularis*) und Tunica externa (*Adventitia*). Zwischen zwei angrenzenden Schichten findet sich jeweils eine elastische Membran (*Membrana elastica interna* bzw. *Membrana elastica externa*). Gesunde Lungenarterie, eigenes Präparat, Mensch, Elastica-van-Gieson-Färbung.

1.1.2 Vaskuläre Besonderheiten der Lungenstrombahn

Der Lungenkreislauf ist physiologischerweise ein Niederdrucksystem

Die Lungenstrombahn ist unter physiologischen Bedingungen durch einen hohen Blutfluss, einen niedrigen Gefäßwiderstand und einen niedrigen Blutdruck charakterisiert (12). Der niedrige Blutdruck dient hierbei insbesondere der Vermeidung eines alveolären Lungenödems, indem die Blut-Luft-Schranke vor zu hohen intravasalen Drücken geschützt wird (13). Die Beziehungen zwischen Blutdruck, Blutfluss und Gefäßwiderstand sind hierbei analog dem Ohm'schen Gesetz zu betrachten (5):

$$R = \frac{U}{I}$$

mit R = Strömungswiderstand, U = Blutdruckdifferenz ΔP und I = Blutfluss. Eine Erweiterung des Ohm'schen Gesetzes stellt das Hagen-Poiseuille-Gesetz dar (5). Zwar gilt dieses streng genommen nur für Newtonsche Flüssigkeiten, näherungsweise ist es jedoch auch auf das Strömungsverhalten des Blutes anwendbar (5):

$$R = \frac{8 \times l \times \eta}{\pi \times r^4}$$

mit R = Strömungswiderstand, l = Länge des Gefäßes, η = dynamische Viskosität des Blutes und r = Innenradius des Blutgefäßes. Nach Kürzung aller für den menschlichen Blutkreislauf konstanten Parameter aus der Gleichung ergibt sich vereinfacht:

$$R = \frac{1}{r^4}$$

Als Kernaussage ergibt sich somit, dass sich der Gefäßwiderstand R umgekehrt proportional zur 4. Potenz des Gefäßradius r verhält. Diese mathematische Beziehung verdeutlicht die überragende Bedeutung des Gefäßdurchmessers für den pulmonal-vaskulären Widerstand (PVR) und folglich auch für den vom rechten Ventrikel aufzubringenden Blutdruck (sog. rechtsventrikuläre Nachlast) (5). Hieraus lässt sich der enorme Stellenwert einer vasodilatorischen Therapie der pulmonalen Hypertonie zur Reduktion der klinischen Symptomatik durch Nachlastsenkung ableiten (14).

Dem pulmonalen Gefäßsystem kommt zusätzlich eine Reservoirfunktion zu (15): Durch vasodilatorische Prozesse und/oder die Rekrutierung initial nicht durchbluteter Gefäßabschnitte kann die Lunge einen Anstieg des Herzzeitvolumens (HZV) auf bis das Sechsfache ohne nennenswerten Anstieg des pulmonalarteriellen Drucks (*pulmonary arterial pressure*, PAP) kompensieren (16).

Ventilations-Perfusions-Inhomogenitäten

Um einen möglichst effizienten Gasaustausch zu gewährleisten, müssen Ventilation und Perfusion optimal aufeinander abgestimmt werden (5). Hierfür besitzt der Lungenkreislauf wesentliche Besonderheiten, so u.a. den Mechanismus der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion (HPV, Synonym: Euler-Liljestrand-Mechanismus) (17). Normalerweise geht ein Sauerstoffmangel (*Hypoxie*) mit einer Dilatation des entsprechenden Gefäßes einher, um die Sauerstoffversorgung reaktiv zu verbessern (18). Die Gefäße des Lungenkreislaufs reagieren auf eine Hypoxie jedoch mit einer Vasokonstriktion (19). Der Sinn liegt darin begründet, dass nicht ventilierte Alveolen auch nicht (unnötig) perfundiert werden müssen, da ein Gasaustausch in nicht ventilierten Alveolen *a priori* unmöglich ist (20).

Physiologischerweise existieren jedoch bereits moderate Ventilations-Perfusions-Inhomogenitäten mit zwei möglichen Maximalausprägungen des Ventilations-Perfusions-*Mismatches* (5): Zum einen besteht die Möglichkeit eines sogenannten Rechts-Links-*Shunts*, bei welchem nicht ventilierte Alveolen trotzdem perfundiert werden (die HPV versagt); zum anderen besteht die Möglichkeit des alveolären Totraumes (5). Der alveoläre Totraum bezeichnet nicht perfundierte, aber ventilierte Alveolen und entspricht somit einer Vergrößerung des anatomischen Totraumes um die jeweils nicht perfundierten Alveolen (5). Idealerweise ist eine Alveole somit sowohl ausreichend ventiliert als auch ausreichend perfundiert (5).

Die hypoxische pulmonale Vasokonstriktion als Bindeglied zwischen Physiologie und Pathophysiologie

Unter physiologischen Bedingungen stellt die HPV einen sinnvollen Mechanismus dar, um das desoxygenierte Blut durch Vasokonstriktion pulmonalarterieller Gefäße in Bereichen lokaler Hypoxie zu den besser ventilierten Lungenabschnitten zu leiten und die Oxygenierung des Blutes so möglichst effizient zu gestalten (20). Bereits milde Hypoxie (alveolärer $pO_2 < 100$ mmHg) führt zu einer Auslösung der HPV (21), welche

bei nachfolgender normoxischer Reexposition - zumindest in Ratten - jedoch vollständig reversibel ist (22).

Die HPV selbst gliedert sich in 3 Phasen (16): Während die akute alveoläre Phase Sekunden bis Minuten andauert, liegt die protrahierte alveoläre Phase bereits in einem Bereich von bis zu mehreren Stunden (16). Der Übergang von der protrahierten alveolären Phase in die Phase chronischer Hypoxie verläuft fließend (23).

Mit zunehmender Chronifizierung verliert die HPV gleichzeitig an Reversibilität (24). So führt eine chronische Exposition gegenüber hypoxischen Verhältnissen (z.B. längerer Aufenthalt in größeren Höhen) sowie anhaltende Hypoxie bei chronischen pulmonalen Erkrankungen (insbesondere COPD) über eine Chronifizierung der HPV mit konsekutiv zunehmender Irreversibilität letztlich zur Ausbildung eines pulmonalen Hypertonus (20). Das Tiermodell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie (**siehe 1.2.5**) macht sich exakt diese (Teil-)Kenntnis der Pathophysiologie der pulmonalen Hypertonie zunutze (25).

1.2 Pulmonale Hypertonie

1.2.1 Definition

Der Begriff der pulmonalen Hypertonie (PH) stellt eine Sammelbezeichnung für eine Gruppe von Krankheiten dar, deren Gemeinsamkeit in einer Erhöhung des pulmonal-arteriellen Druckes (*pulmonary arterial pressure*, PAP) besteht (26). Ab einem pulmonalarteriellen Mitteldruck (mPAP) ≥ 25 mmHg in Ruhe ist das Diagnosekriterium einer PH definitionsgemäß erfüllt (27). Werte < 20 mmHg in Ruhe gelten als physiologisch, Werte zwischen 21 und 24 mmHg in Ruhe sind als grenzwertig anzusehen und werden als sog. *Borderline*-PH bezeichnet (27). Auf eine zusätzliche Messung des mPAP unter Belastung wird neuerdings verzichtet (27), da dieser insbesondere bei älteren Patienten physiologischerweise als zu hoch bestimmt wird (28). Die Druckerhöhung im Lungenkreislauf geht mit einer Druckbelastung des rechten Ventrikels einher, welcher konsekutiv eine Rechtsherzinsuffizienz folgt (29). Die PH führt aufgrund der Rechtsherzinsuffizienz bei Dekompensation in Rechtsherzversagen unbehandelt innerhalb von durchschnittlich 2,8 Jahren ab Diagnosestellung zum Tod (30). Die Stadieneinteilung der PH (**Tabelle 1**) ist in Anlehnung an die Klassifikation der Herzinsuffizienz nach der *New York Heart Association* (NYHA) definiert (31).

Tabelle 1: Funktionelle Klassifikation der PH.

Galie *et al.* (31), modifiziert.

Funktionelle Klasse	Definition
I	Patienten mit PH, aber ohne daraus resultierende Einschränkungen der körperlichen Aktivität. Normale körperliche Aktivität verursacht weder übermäßige <i>Dyspnoe</i> noch <i>Fatigue</i> , Brustschmerzen oder (drohende) <i>Synkope</i> .
II	Patienten mit PH, die durch die Erkrankung leichte Einschränkungen der körperlichen Aktivität erfahren. In Ruhe sind keine Symptome spürbar. Normale körperliche Aktivität führt zu übermäßiger <i>Dyspnoe</i> , <i>Fatigue</i> , Brustschmerzen oder (drohender) <i>Synkope</i> .
III	Patienten mit PH, die deutliche Einschränkungen der körperlichen Aktivität aufweisen. Die Patienten spüren in Ruhe jedoch keine Symptome. Geringe körperliche Aktivität verursacht hingegen übermäßige <i>Dyspnoe</i> , <i>Fatigue</i> , Brustschmerzen oder (drohende) <i>Synkope</i> .
IV	Patienten mit PH, die unfähig sind, körperliche Aktivitäten jeglicher Form auszuüben, ohne Symptome zu erleiden. Es zeigen sich Zeichen einer Rechtsherzinsuffizienz. <i>Dyspnoe</i> und/oder <i>Fatigue</i> können bereits in Ruhe auftreten. Das Unwohlsein wird durch jegliche Art von körperlicher Aktivität verstärkt.

1.2.2 Epidemiologie

Die Angaben zur Häufigkeit der idiopathischen pulmonalarteriellen Hypertonie (IPAH), des Prototyps der PH, schwanken sehr stark (32). Die Zahlen zur Prävalenz reichen von 1-2 pro einer Million bis zu 15 pro einer Million Einwohner (32). Die Inzidenz wird hingegen mit geschätzten 2 Neuerkrankungen pro einer Million Einwohner angegeben (33). Betroffen sind bevorzugt Frauen im gebärfähigen Alter (34). Berücksichtigt man alle Varianten der PH, so ist derzeit von etwa insgesamt 100 Millionen Betroffenen weltweit auszugehen (16).

Wesentlich häufiger als die IPAH sind jedoch solche Formen der PH, die mit anderen Erkrankungen assoziiert sind (**siehe 1.2.3**) (32). Zu diesen Grunderkrankungen zählen u.a. rheumatische Erkrankungen (rheumatoide Arthritis, systemischer Lupus erythematoses, Sklerodermie), angeborene Herzfehler, strukturelle Lebererkrankungen, Leberzirrhose, HIV-Infektionen, chronisch hämolytische Anämien (Sichelzellanämie, Thalassaemia intermedia) und insbesondere die chronische Schistosomiasis (Bilharziose) (35).

Ungeachtet dieser vielen Unterformen der PH soll der Fokus dieser Arbeit (insbesondere in Bezug auf Pathogenese, Diagnostik und Therapie der PH) auf der IPAH bzw. in geringerem Umfang auch auf der chronisch thromboembolischen pulmonalen Hypertonie (CTEPH) liegen.

1.2.3 Klinische Klassifikation

Im Jahr 2013 wurde auf dem 5th *World Symposium on pulmonary hypertension* in Nizza (Frankreich) die bisher aktuellste Version der klinischen Klassifikation der PH (**Tabelle 2**) verabschiedet (36).

Tabelle 2: Aktuelle klinische Klassifikation der PH (Nizza, 2013).

Simonneau *et al.* (36), modifiziert.

Klinische Klassifikation der Pulmonalen Hypertonie
1. Pulmonalarterielle Hypertonie (PAH)
1.1 Idiopathische PAH (IPAH)
1.2 Erbliche Formen der PAH
1.2.1 BMPR2
1.2.2 ALK-1, ENG, SMAD9, CAV1, KCNK3
1.2.3 Unbekannter Genese

1.3 Arzneimittel- und toxininduziert
1.4 Assoziiert mit:
1.4.1 Kollagenosen
1.4.2 HIV-Infektion
1.4.3 Portaler Hypertonie
1.4.4 Angeborenen Herzfehlern
1.4.5 Schistosomiasis
1' Pulmonale venookklusive Erkrankung (PVOD) und/oder pulmonalkapilläre Hämangiomatose (PCH)
1'' Persistierende pulmonalarterielle Hypertonie des Neugeborenen (PPHN)
2. Pulmonale Hypertonie aufgrund von Erkrankungen des linken Herzens
2.1 Linksventrikuläre systolische Dysfunktion
2.2 Linksventrikuläre diastolische Dysfunktion
2.3 Herzklappenerkrankungen
2.4 Angeborene/erworbene Obstruktion des linksventrikulären Ein- und Ausflusstraktes und angeborene Kardiomyopathien (CM)
3. Pulmonale Hypertonie aufgrund von Lungenerkrankungen und/oder Hypoxie
3.1 Chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD)
3.2 Interstitielle Lungenerkrankung (ILD)
3.3 Andere Lungenerkrankungen mit gemischtem restriktiven und obstruktiven Erscheinungsbild
3.4 Schlafapnoe-Syndrom (SAS)
3.5 Alveoläre Hypoventilation
3.6 Chronische Exposition in großer Höhe
3.7 Entwicklungsstörungen
4. Chronische thromboembolische pulmonale Hypertonie (CTEPH)
5. Pulmonale Hypertonie mit unklaren multifaktoriellen Mechanismen
5.1 Hämatologische Erkrankungen: Chronisch hämolytische Anämie, myeloproliferative Erkrankungen, Z.n. Splenektomie
5.2 Systemische Erkrankungen: Sarkoidose, pulmonale Langerhanszellhistiozytose, Lymphangioleiomyomatose
5.3 Metabolische Erkrankungen: Glykogenspeichererkrankung, M. Gaucher, Schilddrüsenerkrankungen
5.4 Andere: Tumorobstruktion, fibrosierende Mediastinitis, chronische Niereninsuffizienz, segmentale PH

1.2.4 Pathogenese

Idiopathische pulmonalerterielle Hypertonie (IPAH)

Die Pathogenese der IPAH versteht sich dem aktuellen Stand der Forschung zufolge als Vaskulopathie, bei der strukturelle Veränderungen aller drei Schichten der Gefäßwand aufgrund exzessiver Zellproliferation und Entzündungsreaktionen durch Rekrutierung zirkulierender Zellen und deren Infiltration in die Gefäßwand eine große Rolle spielen (37).

Vasokonstriktion. Ein zentraler Aspekt in der Pathogenese der PH besteht in einem Ungleichgewicht der vasoaktiven Mediatoren (37): Vasodilatorisch wirksame Mediatoren (v.a. PGI_2 , aber auch zusätzlich antiproliferativ wirkendes NO) sind signifikant reduziert, während potente Vasokonstriktoren wie ET-1 und TXA_2 vermehrt gebildet werden (38). Zudem wird eine Erhöhung der Serotoninkonzentration beobachtet (39); Serotonin wirkt ebenfalls vasokonstriktorisch und stört darüberhinaus den *crossstalk* zwischen Endothelzellen und glatten Muskelzellen (40). Veränderungen sowohl in K^+ als auch in Ca^{2+} Kanälen führen ebenso zu einem pathologisch erhöhtem pulmonalen Gefäßtonus (41). Einige dieser Vasokonstriktoren (ET-1, Serotonin und Ca^{2+}) besitzen außerdem pro-proliferative Potenz, welche sich primär in einer Proliferation glatter Muskelzellen manifestiert (42) (39) (43).

Wachstumsfaktoren. Wachstumsfaktoren tragen ebenfalls einen großen Teil zu dem bei der IPAH im pulmonalen Stromgebiet vorherrschenden pro-proliferativen Milieu bei (37): Wird die Involvierung von VEGF zurzeit noch kontrovers diskutiert (44), so gilt die Beteiligung von PDGF, Mitgliedern der TGF- β Superfamilie und der EGF-Familie sowie der FGF-Familie als gesichert (37). Diese Moleküle entfalten ihre Wirkung nach Bindung an Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK) (37). Dies führt, vermittelt durch intrazelluläre Signalkaskaden, zu erhöhten Zellproliferationsraten, Zellmigration und Resistenz gegenüber Apoptose (45). Des Weiteren wirken Wachstumsfaktoren als *chemo-attractants* für diverse vaskulär differenzierte Zellpopulationen wie bspw. glatte Muskelzellen, Fibroblasten und Endothelzellen (37). HGF hingegen wird als protektiver Faktor für die Entwicklung einer PH angesehen (46).

Proteasen/Elastasen. Als verantwortlich für die Modifizierung von Strukturproteinen der extrazellulären Matrix (EZM) im Rahmen der Pathogenese der PH wurden diverse Proteasen und Elastasen identifiziert (47). Matrix-Metalloproteasen (MMPs) führen außerdem zu einer vermehrten Mobilisierung oben gelisteter Wachstumsfaktoren (48).

Notch. Ein weiteres wichtiges Molekül im Pathogeneseprozess der PH stellt Notch dar (49). Notch-basierte Signalwege finden sich bei diversen Stufen der vaskulären Entwicklung, so u.a. bei der Vaskulogenese, der Angiogenese und der Differenzierung von vaskulären Glattmuskelzellen (50). Notch-responsive Gene sind zudem an HIF-1 α gekoppelt (51) und Notch 3 reguliert die Expression des PDGF-Rezeptor- β auf vaskulären Glattmuskelzellen (52).

PPAR. Ähnlich HGF, kommt auch den PPARs eine protektive Rolle in der Pathogenese der PH zu (53). Diverse Experimente zeigten, dass ein Mangel an PPAR γ möglicherweise mit einer Manifestation einer PH assoziiert ist (54). PPAR γ ist in Prozesse des Zellwachstums, der Inflammation und der Angiogenese involviert (55).

Inflammation. Inflammatorische Prozesse gelten als weiterer wichtiger Pathomechanismus (56). So wurden Monozyten, Makrophagen, T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und dendritische Zellen in den PH spezifischen vaskulären Läsionen detektiert (57). Jedoch nicht nur die Zellen des Immunsystems selbst, sondern auch deren Sezernierungsprodukte in Form von Zytokinen (MCP-1, TNF- α , IL-1 β und IL-6) und Chemokinen scheinen eine wichtige Rolle in der Pathogenese der PH zu spielen (58) (59). Chemokine sind essentiell für verschiedene Schritte der Rekrutierung zirkulierender Leukozyten aus dem Blutstrom, einschließlich der initialen reversiblen Adhäsion (*rolling*), der Aktivierung, der irreversiblen Adhäsion sowie der Extravasation in das entzündete Gewebe (60).

Thrombose. Ein weiterer in der Pathogenese der PH erwähnenswerter Punkt ist die Entwicklung von Thrombosen (61). An PH erkrankte Individuen weisen für gewöhnlich einen hyperkoagulablen Phänotyp auf (62). Dieser kommt durch eine Erhöhung von Gewebsthromboplastin (Faktor III), einem Initiator der extrinsischen plasmatischen Gerinnung, zustande (63). Zugleich findet sich eine Erhöhung von PAI-1, einem Inhibitor der Fibrinolyse, sodass diese beeinträchtigt ist (61). Nicht nur die plasmatische Gerinnung ist zugunsten einer Hyperkoagulabilität verschoben, auch die Thrombozytenaggregation ist durch erhöhte Konzentrationen von TXA₂ bei gleichzeitig verminderter Konzentration von PGI₂ und NO pathologisch gesteigert (37).

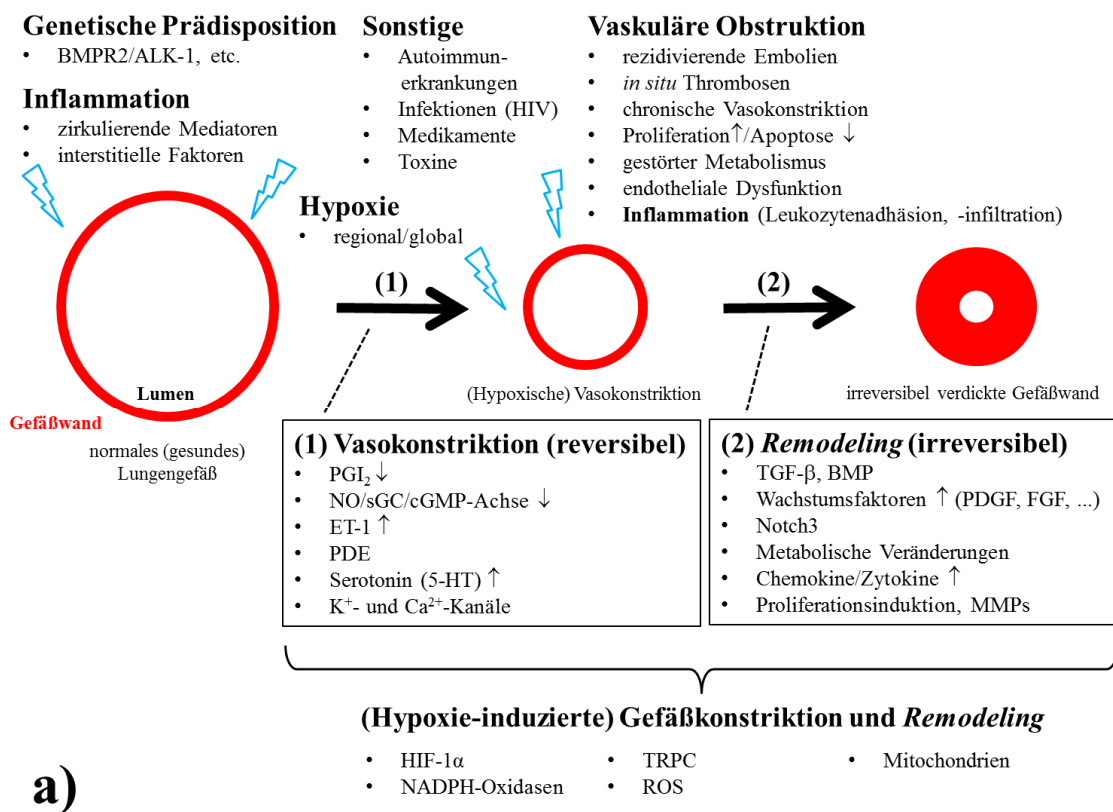
Plexiforme Läsionen. Ein charakteristisches histologisches Merkmal insbesondere der IPAH besteht in der Ausbildung von sog. plexiformen Läsionen (64). Bei plexiformen Läsionen handelt es sich um prominente pulmonalvaskuläre Strukturen, gekennzeichnet durch einen Verschluss des arteriellen Gefäßlumens in Kombination mit aneurysma-

tischen Aussackungen und abnormer Proliferation sowohl von Endothelzellen als auch von glatten Muskelzellen (48).

Allen genannten Faktoren (hauptsächlich der Trias aus exzessiver pulmonaler Vaskokonstriktion, pro-proliferativ geprägtem pulmonalvaskulärem *Remodeling* und inflammatorischen Prozessen) gemeinsam ist eine progrediente Okklusion pulmonaler Gefäße, welche zur Ausbildung der PH-spezifischen Symptomatik mit den Zeichen einer Rechtsherzbelastung bzw. später Rechtsherzinsuffizienz infolge massiver Nachlasterhöhung des rechten Ventrikels führt (65). Dabei ist die Nachlasterhöhung nicht ausschließlich Produkt des verminderten Gefäßquerschnittes (66), sondern ebenso der verminderten *compliance* des Lungengefäßsystems infolge der Neomuskularisation vormals nicht muskularisierter Arterien im Rahmen des *Remodeling* sowie insgesamt der Verdickung der Gefäße, welche mit einer verminderten Dehnbarkeit einhergeht (67). Das Lungengefäßsystem verliert somit seine Reservoirfunktion und folglich die Fähigkeit, Anstiege des HZV bis zu einem gewissen Grad zu kompensieren, was sich wiederum in erhöhten Werten von PVR und PAP bemerkbar macht (12).

Chronisch thromboembolische pulmonale Hypertonie (CTEPH)

Die Pathogenese der CTEPH beruht vermutlich in erster Linie auf einem thromboembolischen Verschluss größerer Lungenarterien und zumindest nicht primär auf pulmonalvaskulärem *Remodeling* (68). Diese allgemein anerkannte „Embolie-Hypothese“ besagt, dass der CTEPH einzelne oder rezidivierende pulmonale Embolien infolge einer Venenthrombose (zumeist tiefe Beinvenenthrombose) zugrunde liegen (69). Der akute Verschluss größerer Lungengefäße führt durch einen Anstieg des PVR zur Ausbildung der klinischen Symptomatik (68). Eine weitere Hypothese vermutet pulmonale *in situ* Thrombosen resultierend aus endothelialer Dysfunktion mit begleitender Makro- und/oder Mikroangiopathie als Ursache (70). Dieses Pathogenesemodell versteht sich ähnlich der Pathogenese der IPAH (71). Gestützt wird es durch die Tatsache, dass in rund 63 % der Fälle von CTEPH keine vorausgegangene akute pulmonale Embolie eruiert werden kann (72) und sich sekundär *Remodeling*-Prozesse in distaleren Gefäßabschnitten von proximal thromboembolisch verschlossenen Arealen nachweisen lassen (71). Risikofaktoren für die Entwicklung einer CTEPH sind das Vorliegen eines Anti-Phospholipid-Syndroms, Z.n. Splenektomie, ein infizierter Herzschrittmacher, chronische Entzündungsprozesse und das Vorhandensein eines ventrikulo-atrialen *Shunts* (68).



b)

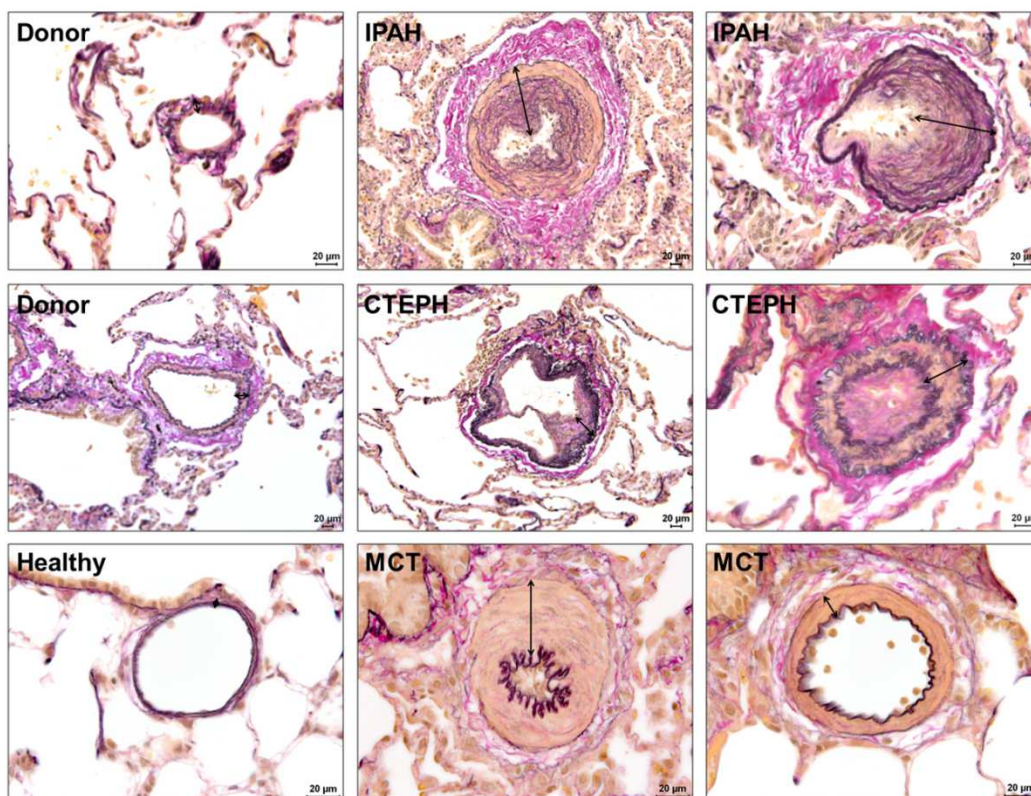


Abbildung 4: Pathophysiologie der PH.

a) Zusammenfassung der in der Literatur etablierten Modelle bezüglich der Pathophysiologie der PH. (ALK-1: *activin receptor-like kinase-1*; BMP: *bone morphogenetic protein*; BMPR2: *bone morphogenetic protein receptor type 2*; Ca^{2+} : Calcium; cGMP: zyklisches Guanosinmonophosphat; FGF: *fibroblast growth factor*; HIF-1 α : Hypoxie-induzierbarer Faktor-1 α ; HIV: Humanes Immundefizienz-Virus; K^+ : Kalium; MMPs: Matrix-Metalloproteasen; NADPH: Nicotinamidadenindinukleotidphosphat; NO: Stickstoffmonoxid; PDE: Phosphodiesterase; PDGF: *platelet-derived growth factor*; PGI_2 : Prostaglandin I_2 ; ROS: *reactive oxygen species*; sGC: lösliche Guanylatzyklase; TGF- β : *transforming growth factor- β* ; TRPC: *transient receptor potential channel*). Selbsterstelltes Schema basierend auf Schermuly *et al.* (37).

b) Morphologisches Korrelat des der Pathogenese der PH zugrunde liegenden *Remodeling*-Prozesses: Die Doppelpfeile repräsentieren jeweils die Wanddicke der pulmonalen Gefäße. Histopathologisch zeigt sich eine Verbreiterung der Gefäßwand mit konsekutiver Einengung des Lumens aufgrund pathologisch erhöhter Proliferationsraten von Endothelzellen, Fibroblasten und glatten Muskelzellen. Der daraus resultierende Anstieg der Nachlast des rechten Ventrikels zeichnet sich für die klinische Symptomatik der PH verantwortlich. Eigene Präparate. Elastica-van-Gieson-Färbung. Humane Lungen (Donor, IPAH und CTEPH) und Rattenlungen (*Healthy* und MCT).

1.2.5 Tiermodelle der PH**Das Modell der Monocrotalin-induzierten PH**

Das Pyrrolizidinalkaloid Monocrotalin (MCT) aus der Pflanze *Crotalaria spectabilis* wurde 1961 erstmals als Auslöser einer Entzündung der Pulmonalarterien in Ratten beschrieben (73). Eine einzelne subkutane Injektion von MCT führt innerhalb von 3-4 Wochen zur Entwicklung einer PH mit vaskulärem *Remodeling*, welches histologisch betrachtet dem der IPAH sehr ähnlich ist (74) und somit a.e. das Patientenkollektiv der Gruppe 1 nach der klinischen Klassifikation der PH repräsentiert, weswegen es in der vorliegenden Arbeit Anwendung fand. Seine Toxizität erlangt MCT durch hepatische Metabolisierung zu den biologisch aktiven Hauptmetaboliten Monocrotalinpyrrol und Dehydromonocrotalin (75), wobei das Endothel der Pulmonalarterien den Hauptangriffspunkt der Substanzen darstellt (76). Hier kommt es innerhalb der ersten Tage zu einer massiven Zellschwellung, danach schließen sich eine frühe exsudative sowie eine späte proliferative Phase an (77). In dem progressiven Verlauf kommt es zu Hyperplasie und Hypertrophie der glatten Muskelzellen insbesondere der präkapillären Arteriolen (78), vermehrten Bildung extrazellulärer Matrixmoleküle wie bspw. Kollagen, Leukozyteninfiltration und Fibrinablagerungen (79). Es kommt zu vaskulären Obstruktionen im pulmonalen Stromgebiet und letztlich zur Ausbildung der PH-spezifischen Symptomatik einer Rechtsherzbelastung bzw. einer Rechtsherzinsuffizienz (80).

Das Modell der MCT-induzierten PH stellt das zurzeit am besten validierte Modell dar und findet bevorzugt bei Ratten Anwendung (81).

Das Modell der Hypoxie-induzierten PH

Auch eine langanhaltende Exposition gegenüber hypoxischen Verhältnissen (chronische Hypoxie) führt zu Umbauprozessen im pulmonalen Stromgebiet, welche v.a. durch einen dauerhaft erhöhten PVR charakterisiert sind (82). Der niedrige pO_2 fördert eine Muskularisierung initial nicht muskularisierter pulmonaler Arterien, Hypertrophie von Fibroblasten und glatten Muskelzellen sowie eine Verdickung präkapillärer Arteriolen (83). Hinzu addiert sich eine proliferativ-vasokonstriktiv geprägte Mediatorenkonstellation (84) mit diskutierter inflammatorischer Komponente (85). Dies führt über die Ausbildung vaskulärer Obstruktionen zur Entwicklung einer manifesten PH (12).

Das Modell der Hypoxie-induzierten PH findet bevorzugt bei Mäusen Anwendung (82). Chronische Hypoxie wird folglich als ein zentraler Faktor in der Pathogenese der PH angesehen (siehe auch klinische Klassifikation der PH, Gruppe 3); somit kommt dieses Modell jenem Patientenkollektiv pathodynamisch betrachtet am nächsten (86).

Das Modell der Hypoxie-induzierten PH ist durch nachfolgende normoxische Reexposition jedoch vollständig reversibel, sowohl die Vasokonstriktion als auch die strukturellen Veränderungen im Sinne eines *Remodeling* betreffend (87); ein Umstand, der es für die Forschung in Bezug auf neue Therapien der PH besonders attraktiv macht.

1.2.6 Klinik & Diagnostik

Klinische Symptomatik

Das klinische Bild der PH ist recht unspezifisch (35). Dies gilt insbesondere in den Frühstadien der Erkrankung (35). Aufgrund dieser Gegebenheiten erfolgt die Diagnose der PH erst relativ spät, was einen wesentlichen Teilaspekt der ungünstigen Prognose bedingt (88). Das Leitsymptom der PH besteht in einer langsam progredienten Luftnot (*Dyspnoe*), zunächst nur unter Belastung, im weiteren Verlauf auch in Ruhe (89). Zusätzlich findet sich häufig eine rasche Ermüdbarkeit (89). In fortgeschrittenen Stadien ist diese Initialsymptomatik meist mit weiteren Symptomen vergesellschaftet (90): Zu einer sich manifestierenden Sinustachykardie kommen Schwindel und/oder Synkopen hinzu; die kardiale Symptomatik wird durch *Angina pectoris* - ähnliche Beschwerden vervollständigt (90). Als Auswirkung der primär pulmonalen Pathologie zeigt sich eine zunächst diskrete Zyanose (90). Mit steigender Druckbelastung des rechten Ventrikels (RV) zeigen sich auch zunehmend Zeichen der Rechtsherzinsuffizienz (gestaute Halsvenen, periphere Ödeme, Nykturie) (90). Eine gefürchtete Spätkomplikation der manifesten PH stellt die Eisenmenger-Reaktion dar (35): Bei nicht diagnostizierten

angeborenen Herzfehlern (*Vitien*) kann es durch den progredienten Druckanstieg im Lungengefäßsystem zu einer sogenannten *Shunt*-Umkehr kommen (35). Hierbei übersteigen die Druckwerte des Lungenkreislaufs diejenigen des Körperkreislaufs (35). Die einzig kausale Therapie in diesem Stadium besteht in einer isolierten Lungentransplantation oder in einer kombinierten Herz-/Lungentransplantation (91).

Initiale Diagnostik: Anamnese & körperliche Untersuchung

Entsprechend der initial unspezifischen Symptomatik ist die Diagnose der PH nicht leicht zu stellen und bedarf insbesondere zur definitiven Diagnosesicherung invasiver Messmethoden (s.u.) (88). Zu Beginn des Diagnose-Algorithmus steht jedoch das sorgfältig geführte ärztliche Gespräch (*Anamnese*), welches v.a. im Hinblick auf die Initialsymptomatik der PH (Luftnot, Müdigkeit und nachlassende körperliche Leistungsfähigkeit) erfolgen sollte (92). Bei der sich anschließenden körperlichen Untersuchung können via Inspektion u.U. Zeichen chronischer Hypoxie (Trommelschlegelfinger, Uhrglasnägel) sowie Halsvenenstauung, Leberhautzeichen (u.a. Spidernävi, Palmar-/Plantarerythem, Lackzunge) und Ödeme nachgewiesen werden (92). Die Palpation dient der Verifizierung der Ödeme und der Feststellung eines eventuell vorhandenen hepatojugulären Reflux (92). Der Auskultationsbefund der Lunge ist bei IPAH unauffällig, bei CTEPH finden sich eventuell Strömungsgeräusche (35). Die Auskultation des Herzens hingegen liefert in fortgeschrittenen Stadien meist eine relative Pulmonalklappeninsuffizienz (diastolisches Graham-Steell-Geräusch) und eine relative Trikuspidalinsuffizienz (Systolikum) (90). Ebenfalls kann ein betonter 2. Herzton auskultatorisch auffällig sein (32).

Laborchemische Diagnostik

Initial ist die Blutgasanalyse unauffällig (32). Im weiteren Verlauf findet sich jedoch eine respiratorische Partialinsuffizienz ($pO_2 \downarrow$; pCO_2 im Normbereich oder sogar \downarrow als Folge der reaktiven Hyperventilation) (32).

Als Verlaufsparemeter eignen sich atriales natriuretisches Peptid (ANP), *brain natriuretic peptide* (BNP) und Troponin I (rechtsventrikuläre Ischämie) (93). Zurzeit findet v.a. die Bestimmung des pro-BNP-Wertes als Verlaufsparemeter Gebrauch (94). NT-proBNP als Marker der Herzinsuffizienz korreliert mit der reduzierten Funktion des rechten Ventrikels (32).

Galectin-3, Aldosteron, sFlt-1 und PlGF sind zurzeit als weitere potenzielle Biomarker in der Diagnostik der PH in Diskussion (95) (96).

Apparative Diagnostik

Im EKG zeigen sich Zeichen einer rechtsventrikulären Dysfunktion wie Rechtsschenkelblock, Rechtsherzhypertrophie und Hinweise auf eine rechtsventrikuläre Repolarisationsstörung (32). Konventionell röntgenologisch sind abrupte Kaliberschwan-
kungen der Lungengefäße mit insbesondere zentral dilatierten Pulmonalarterien sowie ein Verlust peripherer Blutgefäße typisch (97). Zudem sind meist Zeichen einer Rechtsherzhypertrophie nachweisbar (98). Die Beurteilung in der transthorakalen Echokardiographie (TTE) erfolgt anhand interventrikulärer Septumbewegungen, der RV-Myokardmasse, der Wanddicke des RV und potenzieller Trikuspidalregurgitationen als Ausdruck einer Klappeninsuffizienz (32). Neben der Möglichkeit des Ausschlusses kardialer Ursachen für die Symptomatik ist es zudem möglich, mittels TTE indirekt den PAP zu bestimmen (99). Die indirekte Messung liefert zwar keinen exakten Wert, sollte jedoch als nicht-invasives Verfahren einer exakten Messung mittels invasivem Pulmonalarterienkatheter vorausgehen (100). Als weiteres bildgebendes Verfahren kann das Cardio-MRT mit differenzierter Darstellung der RV-Funktion genutzt werden (101). Die definitive Diagnosesicherung der PH erfolgt über die invasive Messung des PAP mittels Rechtsherzkatheter (88). Durch Messung des PVR, des Herzindex und des Vorhofmitteldrucks können Aussagen über den Schweregrad der PH und somit über die Prognose getroffen werden (32). Ein weiterer prognostischer Faktor ist der 6-Minuten-Gehtest, welcher zudem zu einer Therapieverlaufskontrolle herangezogen werden kann (102). Für die Diagnose der CTEPH gilt der positive Befund einer Ventilations-Perfusions-Szintigraphie als beweisend für eine Erhöhung des Gefäßwiderstandes im Lungenkreislauf infolge resoluter pulmonaler Thromben (100). Das Kontrastmittel-CT erlaubt insbesondere eine Beurteilung der großen proximal gelegenen Lungengefäße mit direkter Darstellung eventuell vorhandener Thromben (103). Eine präoperative Pulmonalisangiografie erscheint vor dem Hintergrund einer Thrombendarteriektomie als chirurgische Therapieoption bei CTEPH als sinnvoll (104).

Pharmakologische Testung

Die pharmakologische Testung stellt ein Bindeglied zwischen Diagnose und Therapie dar (100). Im Vordergrund steht die Testung der pulmonalen Gefäßreaktivität auf die Applikation von Vasodilanzien (100). Zeigt sich hierbei eine Reduktion des mPAP im Rechtsherzkatheter um 10 mmHg auf einen Endwert unter 40 mmHg (*Responder*), so ist eine hochdosierte Therapie mit Calciumkanalantagonisten (s.u.) indiziert (105).

1.2.7 Therapie

Konventionelle Therapie: Basistherapie

Die konventionelle Therapie der PH beruht auf einer oralen Antikoagulation, einer Therapie mit Diuretika zur Behandlung der Rechtsherzinsuffizienz bei peripheren Ödemen und Ascites in fortgeschrittenem Stadium sowie dem Einsatz von Glykosiden zur Prävention von atrialen Arrhythmien (31).

PH-spezifische pharmakologische Therapie: Vasodilanzien

Ergibt die pharmakologische Testung einen *Responder*-Status, so ist eine Therapie mit Hochdosis-Calciumkanalantagonisten indiziert (106). Kommt es hierunter jedoch nicht zu einer signifikanten Besserung, so muss eine Therapie mit einer der nachfolgenden drei primär vasodilatorisch wirksamen Medikamentengruppen (**Abbildung 5**) respektive eine Kombinationstherapie bei Beschwerdeprogredienz in Betracht gezogen werden (107).

(1) Prostazyklinanaloga (Prostanoide) zeichnen sich durch vasodilatorische, anti-proliferative, anti-inflammatorische und thrombozytenaggregationshemmende Wirkung infolge intrazellulärer cAMP-Erhöhung aus (108). Zu dieser Wirkstoffgruppe zählen Epoprostenol, Treprostinil, Beraprost und (inhalatives) Iloprost (109).

(2) Phosphodiesterase-Inhibitoren (insbesondere PDE-5-Hemmer wie Sildenafil und Tadalafil) sind durch eine Erhöhung der intrazellulären Konzentration von cGMP primär vasodilatorisch, sekundär jedoch auch proliferationshemmend wirksam (110).

(3) Endothelin-Rezeptor-Antagonisten wird aufgrund des überaus komplexen ET-A/ET-B-Rezeptorisoformen-Dualismus eine ganz besondere Rolle in der Therapie der PH zuteil (111). Stark vereinfacht gilt: Die Blockade von ET-1 als potentem Vasokonstriktor, der infolge der Pathogenese der PH vermehrt gebildet wird (112), führt zu einer pulmonalen Vasodilatation (113) (114). Zudem ist ET-1 in Proliferationsprozesse pulmonalarterieller Glattmuskelzellen involviert (115). Bosentan, Sitaxentan und Ambrisentan sind Vertreter dieser Wirkstoffgruppe (116).

Weisen die Medikamente dieser drei Gruppen zwar positive Nebeneffekte (Anti-Inflammation, Anti-Proliferation, Thrombozytenaggregationshemmung, Endothel-Protektion) für die Therapie der PH auf, so dürfte deren Anteil verglichen mit der jeweiligen vasodilatorisch wirksamen Komponente als eher gering zu evaluieren sein (48).

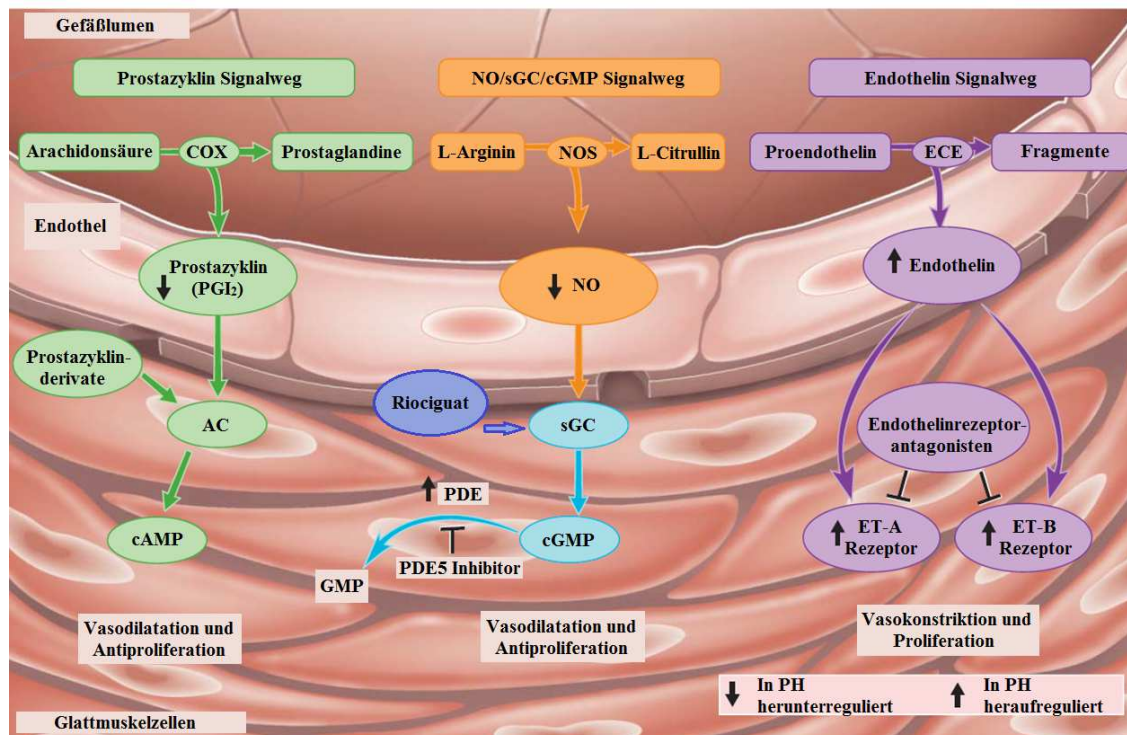


Abbildung 5: Pharmakotherapie der PH.

Die Übersicht zeigt die drei etablierten Hauptklassen von Medikamenten, welche derzeit zur Behandlung der PH eingesetzt werden. Allen gemeinsam ist ein primär vasodilatorisches Wirkprinzip. Positive Nebeneffekte wie bspw. Anti-Proliferation spielen eine eher untergeordnete Rolle. (AC: Adenylatzyklase; cAMP: zyklisches Adenosinmonophosphat; cGMP: zyklisches Guanosinmonophosphat; COX: Cyclooxygenase; GMP: Guanosinmonophosphat; ECE: *endothelin converting enzyme*; ET: Endothelin-1; NO: Stickstoffmonoxid; NOS: NO-Synthase; PDE: Phosphodiesterase; PH: pulmonale Hypertonie; sGC: lösliche Guanylatzyklase). Modifiziert nach Ghofrani und Grimminger (257).

Ultima Ratio: Chirurgische und interventionelle Therapieoptionen

Chirurgisch kann bei IPAH durch eine atriale Septostomie ein artifizieller Rechts-Links-*Shunt* erzeugt werden (117). Dieser führt über eine Senkung des rechtsventrikulären enddiastolischen Drucks zu einer Besserung der Beschwerden bei maximal ausgeschöpfter konservativer Therapie (118).

Bei CTEPH hingegen stellt die pulmonale Thrombendarteriektomie (PEA) den chirurgischen Therapiestandard dar (119). Hierbei wird der Thrombus inklusive eines Teils der Tunica media operativ entfernt (120).

Aufgrund von diversen Komorbiditäten prinzipiell inoperable CTEPH-Patienten können alternativ auch der pulmonalen Ballonangioplastie (BPA) als radiologisch-interventionellem Verfahren zugeführt werden (121); hierbei wird der betroffene Gefäßabschnitt mittels über einen Katheter eingebrachten Ballon dilatiert (122).

Als *Ultima Ratio* steht die Lungentransplantation für beide Formen der PH zur Verfügung (123).

Neuere Therapieansätze inklusive aktuellem Stand der Forschung

Riociguat, ein NO-unabhängiger Stimulator der sGC mit konsekutiver Steigerung der Synthese von vasodilatierend wirkendem cGMP (**Abbildung 5**), bildet einen aktuellen Forschungsschwerpunkt (124). Riociguat gehört zu den wenigen Substanzen, welche explizit für die Therapie der CTEPH empfohlen werden, wenngleich die PEA Goldstandard in der Therapie der CTEPH bleiben wird (125).

Auch der Forschung an Rho-Kinase Inhibitoren wie bspw. Fasudil zur Therapie der PH wird zurzeit große Bedeutung beigemessen (126). Rho-Kinase Inhibitoren zeigten in verschiedenen Experimenten eine Verminderung der arteriellen Neomuskularisation durch Hemmung von Proliferation und Migration glatter Muskelzellen sowie endothelprotektive Potenz durch in erster Linie Erhöhung der NO-Konzentration (127).

Mit Rituximab, einem gegen das B-Zell-Oberflächenantigen CD20 gerichteten monoklonalen Antikörper steht eine Therapie von primär autoimmun bedingten Formen der PH (u.a. sklerodermie-assoziiert) zur Verfügung (128). Schon lange hat Rituximab seinen festen Platz in der Behandlung hämatologischer Neoplasien, insbesondere von B-Zell-Lymphomen, aber auch in der Therapie einer Reihe von Autoimmunerkrankungen (129).

Imatinib, ein Rezeptor-Tyrosinkinase-Inhibitor, ist bereits seit längerem zur Therapie der chronisch myeloischen Leukämie (130) und des gastrointestinalen Stromatumors (131) zugelassen. Imatinib zeichnet sich durch einen inhibitorischen Effekt auf Rezeptoren von Wachstumsfaktoren (zumeist handelt es sich hierbei um RTK) aus, was es insbesondere im Falle des PDGF-Rezeptors als Therapieoption für eine Behandlung der PH attraktiv macht (132). Eine vermehrte Bildung von PDGF wird als ein Faktor in dem komplexen Pathogeneseprozesses der PH angesehen (133).

Eine weitere vielversprechende Substanzgruppe stellen Serotoninantagonisten (bspw. Tergurid) dar (134). Serotonin ist sowohl als Vasokonstriktor als auch Hormon mit proliferativen Effekten auf glatte Muskelzellen in die Etablierung einer PH involviert (135). Die diesem mitogenen Effekt von Serotonin zugrunde liegenden molekularen Mechanismen sind allerdings noch nicht hinreichend charakterisiert (39). Eine Therapie der PH mittels Serotoninantagonisten dürfte v.a. in der Anfangsphase der Erkrankung erfolgversprechend sein (136).

1.3 Das Inkretinhormon *glucagon-like peptide 1*

1.3.1 Physiologische Funktion der Inkretine im Gastrointestinaltrakt

Der Inkretin-Effekt

Die Inkretinfamilie besteht aus einer Gruppe von im Gastrointestinaltrakt gebildeten Peptidhormonen (137). Derzeit sind die beiden Peptidhormone *glucagon-like peptide 1* (GLP-1) und das glucoseabhängige insulinotrope Peptid (GIP) dieser Familie zugehörig (137). Die Inkretine (*intestinal secretion of insulin*) sind im Rahmen des sog. Inkretin-Effektes für die Regulierung der Glucosehomöostase essentiell (138). Der Inkretin-Effekt beschreibt das Phänomen, dass bei Applikation jeweils identischer Mengen an Glucose die intravenöse Applikation zu einer signifikant geringeren Ausschüttung des blutzuckersenkenden Peptidhormons Insulin führt, als eine orale Glucosezufuhr (139). Folglich ist die Menge der Insulinausschüttung aus der Bauchspeicheldrüse (*Pankreas*) nicht ausschließlich durch die Blutglucosekonzentration determiniert, sondern wird zusätzlich durch intestinale Faktoren wesentlich beeinflusst (140). Auf Basis experimenteller Daten wird der Umfang des Inkretin-Effekts in Abhängigkeit von der Glucosemenge auf bis zu 75 % der Insulinantwort geschätzt (141). Diesen Umstand macht sich die Forschung zur Therapie des Typ-II-Diabetes mellitus (T2DM) zunutze (142). Im Folgenden soll näher auf das für diese Arbeit relevante GLP-1 eingegangen werden.

Synthese, Sekretion und Abbau von *glucagon-like peptide 1* (GLP-1)

GLP-1 entsteht durch posttranslationale Prozessierung des Proglucagonmoleküls (143). Das korrespondierende Gen findet sich beim Menschen auf dem langen Arm des Chromosoms 2 (144) und wird hauptsächlich in Pankreas, Darm und Gehirn exprimiert (145) (146). Die Prozessierung des Proglucagonmoleküls erfolgt dabei gewebsspezifisch (140): In den A-Zellen des Pankreas wird größtenteils Glucagon gebildet und nur sehr geringe Mengen an GLP-1 werden freigesetzt (147). Der Hauptbildungsort von GLP-1 sind die endokrinen L-Zellen des distalen Dünndarmes (*Ileum*) und des Dickdarmes (*Colon*) (148). In den L-Zellen entsteht das zunächst noch biologisch inaktive GLP-1 (1-37); es wird durch Abspaltung sowohl seiner 6 N-terminalen Aminosäuren als auch der C-terminalen Aminosäure sowie Amidierung am C-Terminus in die biologisch aktive Hauptisoform GLP-1 (7-36)NH₂ (nachfolgend vereinfacht als GLP-1 bezeichnet) überführt (149) (150).

Die intestinale Freisetzung von GLP-1 wird physiologischerweise primär durch Nahrungsaufnahme stimuliert; hierbei wird eine Sekretion von GLP-1 insbesondere nach kohlenhydrat- und fettreicher Nahrung beobachtet (151). Als Mechanismus wird eine Stimulation von hormonalen und neuronalen (v.a. *N. vagus*) Mediatoren der GLP-1 Sekretion durch Nahrungsbestandteile diskutiert (152). Als solche Mediatoren wurden tierexperimentell u.a. GIP, GRP, ACh und Leptin identifiziert (140). Eine Inhibierung der GLP-1 Freisetzung durch Somatostatin gilt als gesichert (153); eine mögliche Inhibierung durch Insulin wird diskutiert (154). Der mittlere basale Plasmaspiegel von GLP-1 beträgt 7 ± 1 pmol/L und steigt postprandial auf 41 ± 5 pmol/L an (155).

Der Abbau von GLP-1 erfolgt bevorzugt durch die Serinprotease Dipeptidylpeptidase-IV (DPP-IV, CD26); DPP-IV spaltet GLP-1 in das Spaltprodukt GLP-1 (9-36)NH₂ (140). Die Inaktivierung durch DPP-IV erfolgt relativ zeitnah auf die Sekretion, sodass eine Halbwertszeit (HWZ) des biologisch aktiven GLP-1 als Ligand des GLP-1 Rezeptors (GLP-1R) von nur durchschnittlich 2 Minuten resultiert (156). Die Expression von DPP-IV im Gastrointestinaltrakt, auf dem vaskulären Endothel sowie eine zirkulierende lösliche Form (157) erklären, warum das meiste GLP-1 im Blutstrom bereits in Form von jedoch nur vermeintlich inaktivem GLP-1 (9-36)NH₂ vorliegt (158). Dieses Molekül besitzt zwar kaum Affinität zum GLP-1R, ist jedoch biologisch keineswegs unwirksam (140). Es wirkt vermutlich GLP-1R unabhängig (indirekt) insbesondere auf das kardiovaskuläre System (159), während GLP-1 durch die Aktivierung von GLP-1R hauptsächlich im Dienst der Glucosehomöostase steht (sog. *proposed dual pathway* des GLP-1) (160). Alternative Wege der Inaktivierung von GLP-1 wie bspw. die Spaltung durch ubiquitär membranständige Endopeptidasen (161) oder die renale Elimination (162) spielen hingegen eine eher untergeordnete Rolle.

Biologische (Haupt)-Wirkung von GLP-1

Die Hauptwirkung von GLP-1 besteht in der glucoseabhängigen Insulinsekretion (Inkretin-Effekt, s.o.) (163). Zudem bewirkt GLP-1 eine Sensibilisierung der β -Zellen des Pankreas für Glucose, was in einer zusätzlichen Steigerung der Insulinsekretion resultiert (164). Zusätzlich besteht eine deutlich stärkere Reaktion bereits glucosesensibler β -Zellen auf einen Reiz durch Glucose nach vorausgegangener GLP-1 Exposition (165). Die verstärkte Insulinsekretion ist a.e. durch eine direkte Erhöhung der Transkription des Proinsulingens zu erklären (166). Reaktiv liegt eine Verringerung der Glucagonsekretion aus pankreatischen A-Zellen vor (167). Darüber hinaus wird GLP-1 als ein

Differenzierungsfaktor für ductale pankreatische Zellen angesehen, die sich GLP-1 abhängig zu pankreatischen β -Zellen differenzieren (168). Weitere anti-diabetogene Effekte neben der Beeinflussung der β -Zellfunktion bestehen u.a. in einer Verzögerung der Magenentleerung (169), der Inhibition der gastralen Säuresekretion (170) sowie einer Verlangsamung der Motilität des oberen Dünndarms (171) (**Abbildung 6**). Ebenfalls wirkt GLP-1 durch die Bindung an einen im Zentralnervensystem (ZNS) lokalisierten hypothalamischen Rezeptor anti-diabetogen, indem es zu einer Appetitminderung führt und so die Nahrungsaufnahme verringert (172).

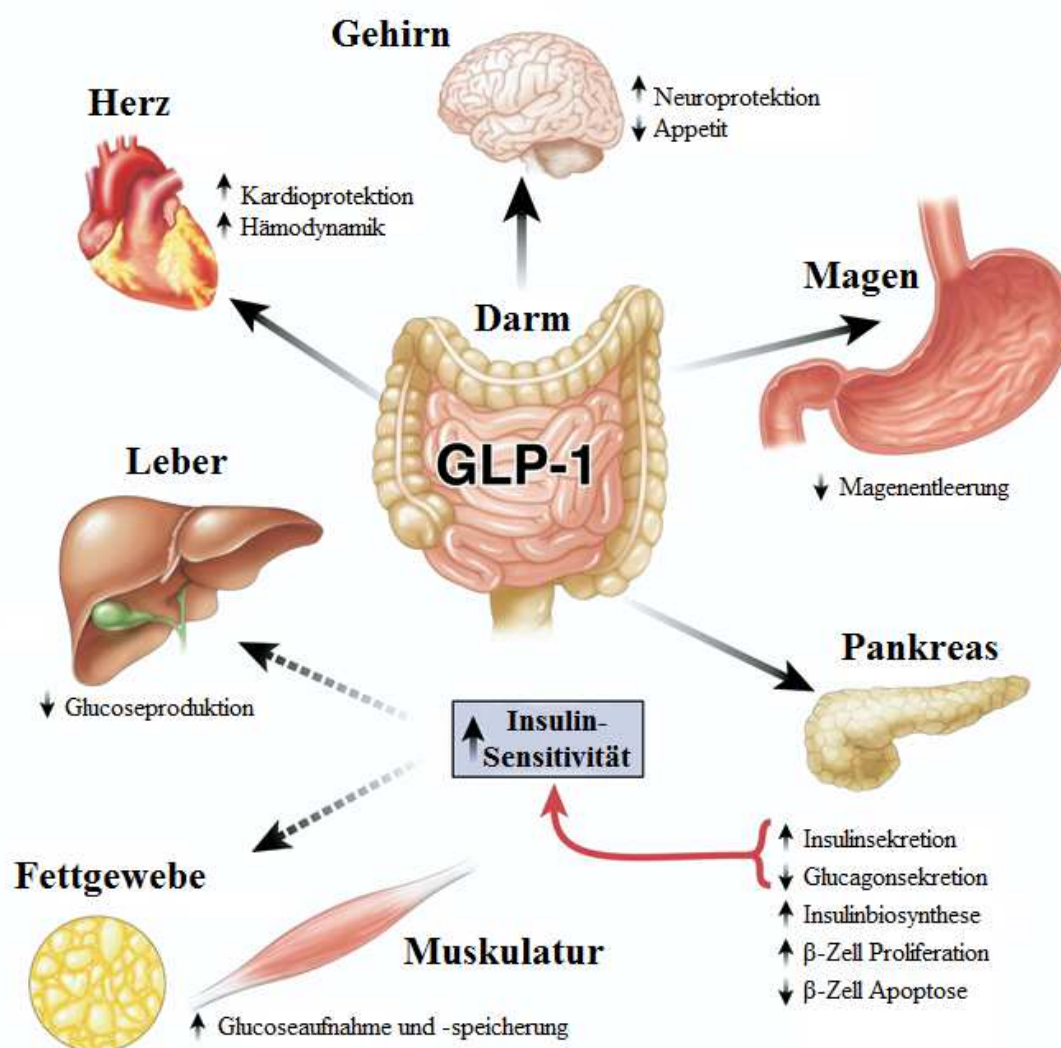


Abbildung 6: Biologisches Wirkspektrum von GLP-1.

GLP-1 ist ein essentielles Hormon für die Glucosehomöostase. Es greift auf Ebene des Pankreas, des Magens, des Fettgewebes, der Leber, der Muskulatur und des Gehirns anti-diabetogen in den Glucosestoffwechsel ein. Am Herzen wirkt es zudem kardioprotektiv und führt zu verbesserten hämodynamischen Parametern. Modifiziert nach Baggio und Drucker (140).

1.3.2 Die Anwendung von Inkretinanaloga & DPP-IV-Inhibitoren in der Therapie des Typ-II-Diabetes mellitus

Dieser primär insulinotrope Effekt von GLP-1 bei gleichzeitig praktisch nicht vorhandenem Hypoglykämie-Risiko macht diese Substanz insbesondere für die Therapie des T2DM attraktiv (137). Die Erhöhung des GLP-1 Plasmaspiegels kann dabei prinzipiell auf zweierlei Wegen erfolgen: Zum einen durch eine direkte Applikation von exogenem GLP-1 (bzw. synthetischer Analoga mit optimierten Eigenschaften der Pharmakokinetik und Pharmakodynamik zumeist zugunsten einer verlängerten HWZ bedingt durch eine Resistenz gegenüber DPP-IV-vermitteltem proteolytischen Abbau), zum anderen durch die Hemmung des GLP-1 degradierenden Enzyms DPP-IV selbst (173). Beide Wege sind sowohl präklinisch-experimentell als auch in vielfachen klinischen Studien inzwischen ausreichend erprobt und finden daher derzeit Anwendung zumeist in einer Kombination mit Metformin als sog. orale antidiabetische Therapie (174) (175). Die Wirkstoffe Exenatid, Liraglutid, Albiglutid, Dulaglutid, Lixisenatid und Taspoglutid repräsentieren solch synthetische GLP-1 Analoga (176). Im klinischen Alltag sind Exenatid und Liraglutid hierbei die gebräuchlichsten und somit am ausführlichsten evaluierten Substanzen (177). Exenatid stellt die synthetische Variante von Exendin-4, einem natürlicherweise im Gift der Gila-Krustenechse (*Heloderma suspectum*) enthaltenen Glykoprotein dar, welches GLP-1 in Struktur und Wirkung sehr stark ähnelt (178). Zurzeit zugelassene Wirkstoffe von DPP-IV-Inhibitoren sind Sitagliptin, Vildagliptin, Saxagliptin, Linagliptin, Alogliptin und Teneligliptin (179).

Kennzeichnend für die Therapie des T2DM mit GLP-1 Analoga bzw. DPP-IV-Inhibitoren sind signifikante Differenzen bezüglich der Wirkung nicht nur zwischen den beiden Wirkstoffgruppen (180), sondern auch unterhalb den Substanzen innerhalb der gleichen Wirkstoffgruppe zusätzlich zu den *a priori* vorhandenen Differenzen bedingt durch Dosierung, Verabreichungsschemata und Applikationsformen (181). Aufgrund dieser Komplexität soll der Fokus sämtlicher im Folgenden beschriebenen Effekte von GLP-1 Analoga insbesondere auf Exenatid (~ Exendin-4) liegen; weitere GLP-1 Analoga sowie DPP-IV-Inhibitoren hingegen werden absichtlich größtenteils vernachlässigt. Für ein volles Verständnis der Wirkungsweise von GLP-1 Analoga und DPP-IV-Inhibitoren sind weitere Untersuchungen insbesondere unter Berücksichtigung der Existenz mehrerer Formen von GLP-1 und deren unterschiedlichen Wirkmechanismen (direkt: GLP-1R abhängig vs. indirekt: GLP-1R unabhängig) erforderlich (140) (182).

1.3.3 Die Entdeckung eines erweiterten Wirkspektrums von GLP-1

Die führende Todesursache bei an T2DM leidenden Patienten besteht in der Etablierung kardiovaskulärer Komplikationen durch die langanhaltende Exposition gegenüber hyperglykämischen Zuständen mit konsekutiver Entwicklung multipler Mikro- und Makroangiopathien (**Abbildung 7**) (160). So ist die diabetes-typische hohe Mortalität und Morbidität letztlich auf die Manifestation einer Arteriosklerose in multiplen Gefäßabschnitten inklusive ihrer jeweiligen Folgeerkrankung wie koronarer Herzkrankheit und Myokardinfarkt (MI) bei Beteiligung der Koronararterien oder Apoplex bei Beteiligung der extrakraniellen hirnversorgenden Arterien zurückzuführen (177). Durch die im Rahmen der Diabetes-Forschung intensivierte Auseinandersetzung mit den Inkretinen wurden neuerdings vielfach positive Effekte von GLP-1 auf das kardiovaskuläre System nachgewiesen und ihrerseits zum Gegenstand der Forschung erhoben (183).

GLP-1 und speziell kardiovaskuläre Wirkmechanismen

Hyperglykämie. Allein die Reduktion der chronischen Hyperglykämie durch GLP-1R Agonisten (deren anti-diabetogener Primäreffekt) bedingt bereits eine Senkung des kardiovaskulären Risikoprofils (160). Die diesbezüglich positiven Effekte von Exenatid wurden durch einen Nachweis der Senkung des Anteils von glykiertem Hämoglobin (HbA_{1c}) in den sog. DURATION-Studien verifiziert (184). Die LEAD-Studien stellen das Pendant unter Verwendung von Liraglutid dar und zeigten ähnliche Resultate (185).

Adipositas. Die - neueren Studien zufolge nicht ausschließlich - hypothalamisch (s.o.) vermittelte Appetitminderung (186) (187) führt in Kombination mit einer verzögerten Magenentleerung (188) über eine Gewichtsreduktion zu einem verbesserten kardiovaskulären *outcome* (177). Zudem sind GLP-1R Agonisten eine der wenigen anti-diabetisch wirksamen Medikamente, welche nicht mit einer Gewichtszunahme als Nebenwirkung einhergehen (177). Insbesondere Liraglutid zeigte in den LEAD-Studien eine Gewichtsreduktion durch v.a. Verringerung des viszeralen Fettgewebes (189).

Bluthochdruck. Exenatid führt zu einer signifikanten Reduktion des systolischen Blutdruckes, wohingegen der diastolische Blutdruck keine signifikante Änderung erfährt (190). Die Verminderung des systolischen Blutdruckes wird tierexperimentell auf eine gesteigerte Natriurese mit konsekutiv gesteigerter Diurese in Kombination mit einer Erhöhung der glomerulären Filtrationsrate und des renalen Blutflusses zurückgeführt (191). In Menschen konnte bisher nur eine GLP-1R vermittelte verminderte renale Na⁺-Rückresorption nachgewiesen werden (192).

Zudem wirkt GLP-1 durch einen GLP-1R vermittelten Aktivitätsanstieg der eNOS mit folglich erhöhten Spiegeln von NO vasodilatorisch und endothelprotektiv (182).

Vasodilatorische Effekte kommen nicht nur GLP-1R vermittelt (direkt), sondern auch durch GLP-1 (9-36)NH₂ (indirekt), d.h. GLP-1R unabhängig zustande (193). Besonders deutlich wird dieser *proposed dual pathway* der GLP-1 Wirkung bei dem von Li Ding und Jin Zhang nachgewiesenen Effekt der Aktivitätssteigerung der eNOS in HUVECs nach GLP-1 Applikation durch beide Wege (182).

Fettstoffwechselstörung. Exenatid senkt signifikant die Plasmaspiegel von Triglyceriden, Gesamtcholesterin, LDL-Cholesterin und führt gleichzeitig zu erhöhten Serumkonzentrationen von HDL-Cholesterin (194). Liraglutid senkt hingegen zusätzlich die Plasmaspiegel von BNP und CRP; beides Biomarker für ein erhöhtes kardiovaskuläres Risikoprofil (195). Tierexperimentell wurde zudem eine Steigerung der peroxisomalen und mitochondrialen β -Oxidation nachgewiesen (196).

Jedoch scheinen GLP-1 und dessen Analoga auch direkt positive Effekte auf das kardiovaskuläre System zu haben, welche in keinem Zusammenhang mit einer initialen Senkung der kardiovaskulären Risikofaktoren stehen (197). Diese Effekte sind zum einen GLP-1R vermittelt, finden zum anderen aber auch GLP-1R unabhängig statt (193).

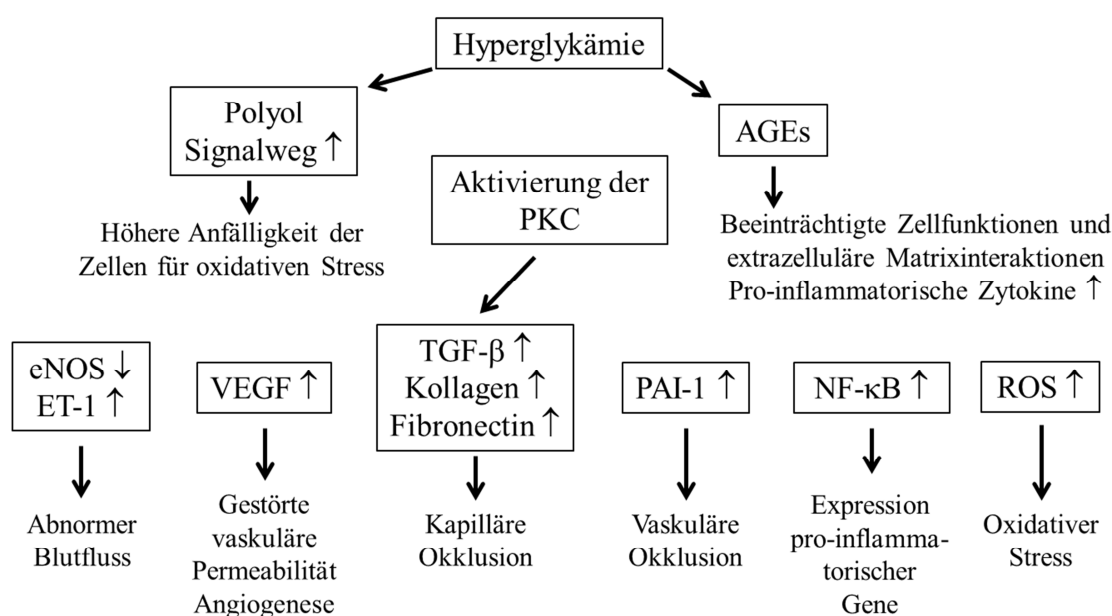


Abbildung 7: Konsequenzen chronischer Hyperglykämie für die vaskuläre Integrität.

AGEs: *advanced glycation end products*; eNOS: endotheliale NO-Synthase; ET-1: Endothelin-1; NF- κ B: nukleärer Faktor- κ B; PAI-1: Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1; PKC: Proteinkinase C; ROS: *reactive oxygen species*; TGF- β : *transforming growth factor*- β ; VEGF: *vascular endothelial growth factor*. Selbsterstelltes Schema basierend auf Sjöholm (160).

Michael H. Davidson fasste diese insbesondere kardioprotektiv geprägten Wirkungen (**Tabelle 3**) zusammen (197). Zusätzlich wurden experimentell eine erhöhte myokardiale Glucoseaufnahme (198), eine Verbesserung der Reperfusion bei Z.n. MI (199) sowie anti-apoptotische (zytoprotektive) Effekte auf Kardiomyocyten (200) unter GLP-1 Applikation nachgewiesen.

Tabelle 3: Speziell kardioprotektive Wirkungen von GLP-1.

Michael H. Davidson (197), modifiziert.

Positive primär kardiale Effekte:
• Reduktion der Infarktgröße bei Z.n. MI
• Verbesserte myokardiale Kontraktilität
• Verbesserte linksventrikuläre Hämodynamik
• Erhöhte LVEF
• Verbesserte Wandindizes bei Z.n. MI

GLP-1 und Arteriosklerose

Die Arteriosklerose stellt ein sehr komplexes Krankheitsbild dar, welches hauptsächlich durch inflammatorische Prozesse gekennzeichnet ist (201). Hierbei spielt die Interaktion zwischen Monocyten/Makrophagen und Endothelzellen eine zentrale Rolle in der Formation der arteriosklerotischen Plaques (202). So wird die Adhäsion und Akkumulation von im Blutstrom zirkulierenden Monocyten an die Endothelzellen der Intima als einer der ersten Schritte in der Pathogenese der Arteriosklerose verstanden (203). Dieser Adhäsions- und Akkumulationsprozess wird durch spezifische Adhäsionsmoleküle und deren korrespondierende Rezeptoren vermittelt (204). Zu einem späteren Zeitpunkt der Erkrankung dringen die adhärenen Monozyten in die Gefäßwand ein (205). Zudem erfolgt CD36-vermittelt die Aufnahme von oxidiertem LDL sowie eine Differenzierung in arteriosklerose-typische Schaumzellen (206). Es kommt zu einer Entzündung der Gefäßwand, begleitet durch verschiedene Zytokine und Chemokine, welche durch pro-inflammatorische Zellen sezerniert werden (207). Bei weiterer Progression führt die Arteriosklerose letztlich zur Okklusion des betroffenen Gefäßes und stellt somit einen potenziell lebensbedrohlichen Zustand dar (208). Kardiovaskuläre Erkrankungen auf dem Boden einer manifesten Arteriosklerose (MI, Apoplex) repräsentieren den Hauptgrund für die diabetes-assoziierte hohe Mortalität und Morbidität (160) (209).

Es gilt zu beachten, dass die Pathogenese der Arteriosklerose und die der PH signifikante Gemeinsamkeiten aufweisen (Merkmale der unkontrollierten Inflammation und Proliferation mit konsekutiver Okklusion von Gefäßen), jedoch selbstverständlich keineswegs als identisch zu betrachten sind. Dennoch besteht die Möglichkeit, dass Substanzen, welche positiv in die Pathogenese der Arteriosklerose intervenieren zugleich auch einen Benefit in der Behandlung der PH mit sich bringen könnten.

In der Tat haben GLP-1 Analoga - hauptsächlich jedoch tierexperimentell - eine anti-arteriosklerotische Potenz, insbesondere durch anti-inflammatorische Effekte sowie Inhibierung der Monocyten-/Makrophagenadhäsion vermittelt, bewiesen (210).

So verringerte Exendin-4 in einem Mausmodell die Monocytenadhäsion an die Endothelzellen der thorakalen Aorta und reduzierte die Größe der arteriosklerotischen Plaques (210). Zusätzlich wurde die Expression von ICAM-1 signifikant, die von VCAM-1 tendenziell durch Exendin-4 Applikation herunterreguliert (210). Des Weiteren supprimierte Exendin-4 via GLP-1R Aktivierung die LPS-induzierte Freisetzung pro-inflammatorischer Moleküle wie TNF- α und MCP-1 (210). Hierfür wurde eine dem GLP-1R nachgeschaltete Signalkaskade bestehend aus cAMP und PKA als Ursache ermittelt (210).

Nagashima *et al.* konnten in einem weiteren Mausmodell zeigen, dass GLP-1 zudem zu einer verminderten CD36-Expression auf Peritonealmakrophagen, einer Verminderung der Cholesterol-Ester-Akkumulation sowie einer Suppression der Schaumzell-Formation führt (211).

Liraglutid hingegen reduzierte in einem Zellkulturexperiment mit HUVECs signifikant den oxidativen Stress durch Inhibierung der TNF- α induzierten Synthese von ROS (212). Weiterhin konnte eine Inhibierung des potenten Vasokonstriktors ET-1 bei gleichzeitiger Steigerung der eNOS-Aktivität durch Liraglutid gezeigt werden (213). Diese Konstellation birgt nicht nur ein hohes anti-arteriosklerotisches Potenzial, sondern eine pathologisch gesteigerte ET-1 Expression ist auch als Teilaspekt in die Pathogenese der PH involviert (214).

In humanen Monocyten konnte eine Herabregulation des an der Pathogenese der Arteriosklerose maßgeblich beteiligten Oberflächenrezeptors CD11b unter Exendin-4 nachgewiesen werden (210). Dies suggeriert zumindest eine partielle Übertragbarkeit der Ergebnisse aus dem Mausmodell auf den menschlichen Organismus.

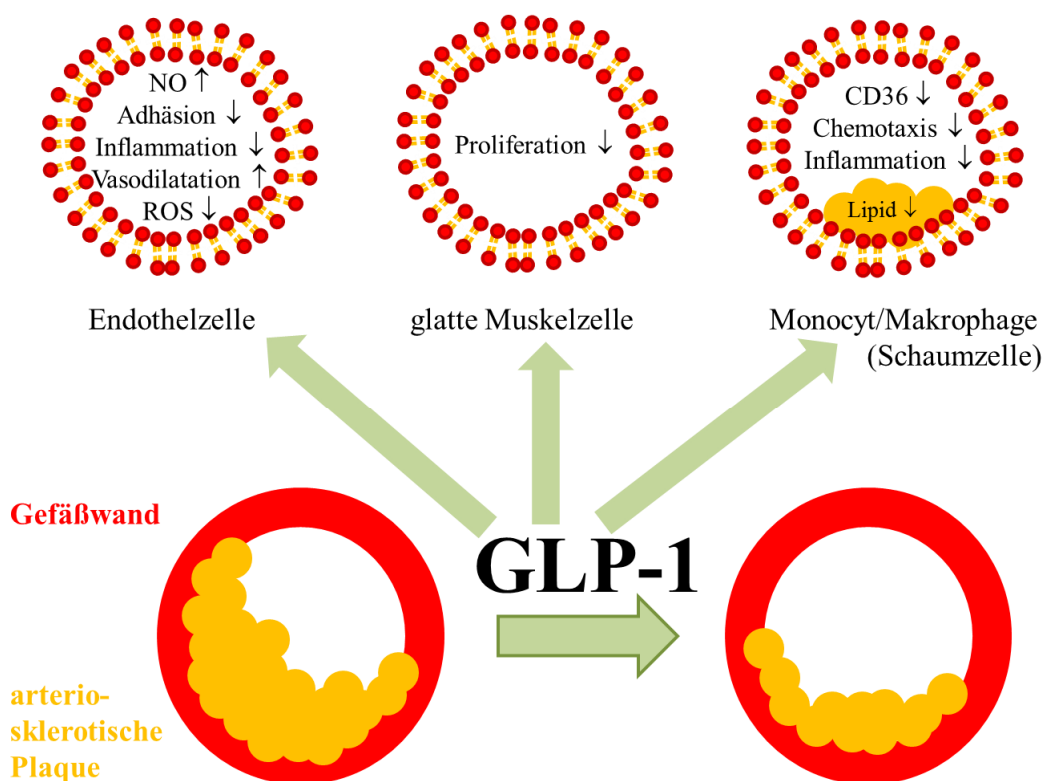


Abbildung 8: Anti-arteriosklerotisches Wirkpotenzial von GLP-1.

Die Wirkungen von GLP-1 auf Endothelzellen, glatte Muskelzellen, Makrophagen sowie die Regulation des Lipidprofils beeinflussen die Entstehung und/oder Progression arteriosklerotischer Plaques. (GLP-1: *glucagon-like peptide 1*; NO: Stickstoffmonoxid; ROS: *reactive oxygen species*). Modifiziert nach Mita und Watada (239) sowie Ussher und Drucker (240).

Der Einfluss von GLP-1R Agonisten auf eine Neointima-Formation

Hirata *et al.* konnten 2013 eine reduzierte Neointima-Formation in den Femoralarterien von Mäusen nach künstlich gesetzter Gefäßläsion durch Exendin-4-Applikation nachweisen (215). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Zellen der Neointima histomorphologisch glatten Muskelzellen entsprechen (immunhistochemischer Nachweis von *α-smooth muscle actin*) und GLP-1R exprimieren (215). Zellkultur-Experimente gaben Anlass zur Vermutung, dass ein dem GLP-1R nachgeschalteter cAMP/PKA-Signalweg für den anti-proliferativen Effekt von Exendin-4 auf glatte Muskelzellen verantwortlich ist (215). Zudem wurde eine anti-inflammatorische Potenz von Exendin-4 durch eine Verminderung der LPS-induzierten TNF- α -Freisetzung aus Peritonealmakrophagen nachgewiesen (215). Experimente einer anderen Gruppe zeigten ähnliche Effekte bezüglich der Reduktion einer Neointima-Formation und anti-proliferativem Effekt auf glatte Muskelzellen von Linagliptin, einem DPP-IV-Inhibitor (216).

GLP-1 vermittelte Effekte ohne direkten oder indirekten Einfluss auf die Glucose-homöostase oder das kardiovaskuläre System

Im ZNS ließen sich experimentell Effekte von GLP-1 nachweisen, welche nicht im Dienst der Regulierung des Blutglucosespiegels stehen (140). So zeigte GLP-1 eine Reduktion von Amyloid-*Precursor*-Protein und β -Amyloid, welche in die Pathogenese der Alzheimer-Demenz involviert zu sein scheinen (217). Demzufolge ließ sich unter der Applikation von GLP-1 in einem Rattenmodell auch eine Verbesserung von Gedächtnis sowie Lernprozessen feststellen (218). In einem gut etablierten Glutamat-Modell der Neurodegeneration bei Ratten wirkte GLP-1 ebenfalls neuroprotektiv und zeigte zusätzlich differenzierungsfördernde Effekte auf neuronale Zellen (219). Hypophysär bewirkt GLP-1 hingegen eine Steigerung der Sekretion von TSH, LH und ADH (220). In der Lunge führt GLP-1 zu einer gesteigerten Aktivität der submukösen Trachealdrüsen, Relaxation von PASMCs und vermehrten Surfactant-Bildung durch Stimulation von Typ-II-Pneumozyten (140). Diese Effekte wurden sowohl bei der Ratte als auch beim Menschen beobachtet (140). Zuletzt wurden diverse renoprotektive Effekte von GLP-1 beschrieben und neuerdings wird zusätzlich von einem Profit von GLP-1 in der Behandlung der nicht-alkoholischen Steatohepatitis (NASH) ausgegangen (221).

1.3.4 Der GLP-1 Rezeptor

Der GLP-1 Rezeptor (GLP-1R) gehört zur B-Familie der aus 7 Transmembrandomänen bestehenden heterotrimeren G-Protein gekoppelten Rezeptoren (222). Das für den humanen GLP-1R kodierende Gen wurde auf dem langen Arm des Chromosoms 6 lokalisiert (223), die Aminosäuresequenz des GLP-1R ist bei Ratte und Mensch zu etwa 90 % identisch (140).

Exprimiert wird GLP-1R auf den α -, β - und δ -Zellen des pankreatischen Inselorgans, Lunge, Herz, Niere, Magen (222) und in verschiedenen Regionen des ZNS inklusive Hypothalamus, Hypophyse und Hirnstamm von Mensch und Nagetieren (140). Eine GLP-1R Expression in Muskel- und Fettgewebe von Mensch und Ratte wird kontrovers diskutiert, bei Hunden konnte ein solcher Nachweis jedoch erbracht werden (224). Auch Lokalisationen auf multiplen Strukturen des kardiovaskulären Systems sind neuerdings insbesondere bei Mäusen beschrieben worden (193). Das extrazellulär lokalisierte N-terminale Ende des GLP-1R ist für die Ligandenbindung essentiell (140). Je nach intrazellulär gekoppeltem G-Protein (G_{α_s} , G_{α_q} , G_{α_i} und G_{α_o}) hat eine Aktivierung des GLP-1R verschiedene Zellantworten zur Folge (225) (226): Ein Anstieg von intrazellulärem

Ca^{2+} und Aktivitätssteigerungen von AC bzw. PLC sind ebenso beschrieben wie Aktivierungen von PKA, PKC, PI3-K, Epac2 und des MAP-K Signalweges (140).

Neben der Signalkaskade in den β -Zellen des Pankreas ist insbesondere die dem GLP-1R nachgeschaltete Signalkaskade in Endothelzellen ausführlich erforscht (227) (228): In Endothelzellen kommt es cAMP/PKA-vermittelt zu einer Erhöhung der eNOS-Aktivität (**Abbildung 9**) mit konsekutiver Relaxation von glatten Muskelzellen (228). Einige Ergebnisse anderer Autoren wiederum sehen den durch GLP-1 vermittelten Anstieg der eNOS-Aktivität auch GLP-1R unabhängig zustande kommen (182) (193).

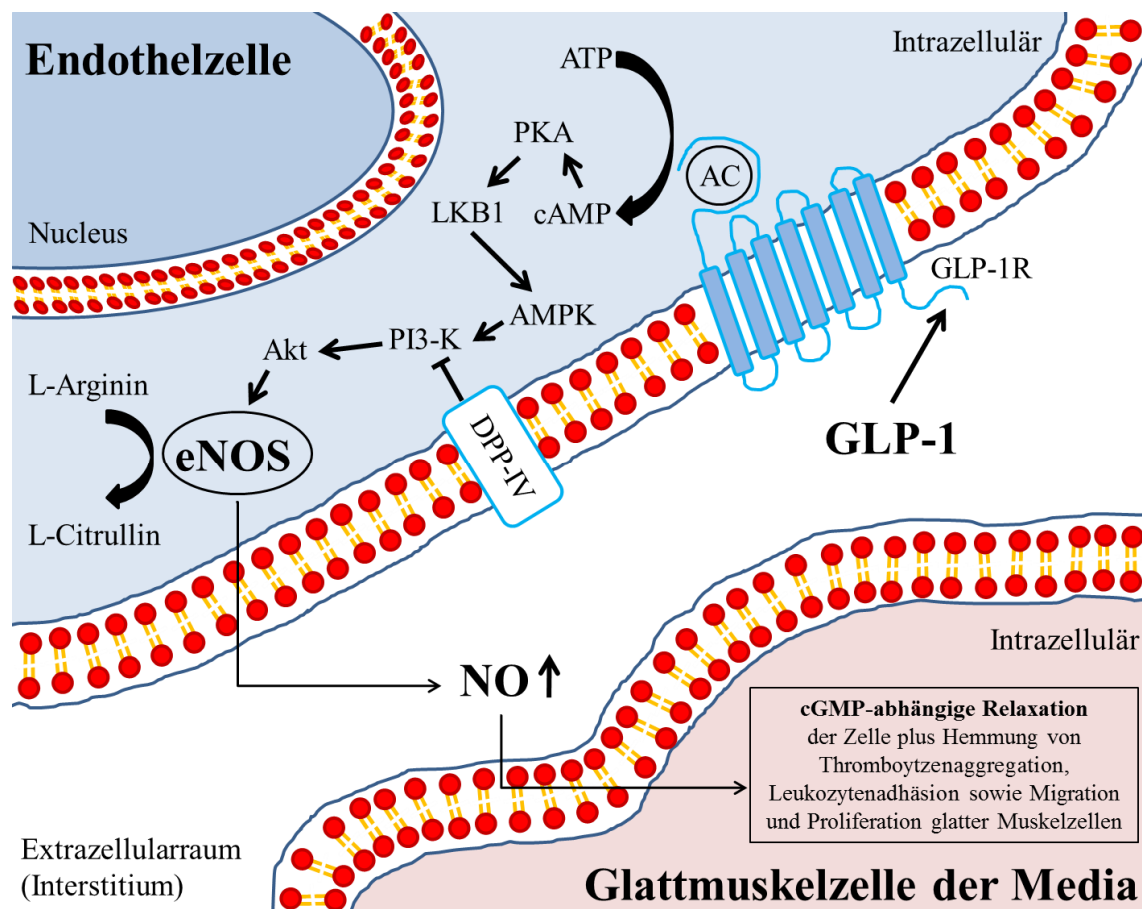


Abbildung 9: GLP-1R vermittelte Relaxation glatter Muskelzellen.

GLP-1 bindet an den auf der Endothelzelle lokalisierten GLP-1R. Die nachgeschaltete intrazelluläre Signalkaskade führt zu einer Erhöhung der eNOS-Aktivität mit gesteigerter NO-Produktion. NO diffundiert in die benachbarten glattmuskulären Zellen und führt cGMP-abhängig zu einer Dilatation des entsprechenden Gefäßes. (AC: Adenylatzyklase; Akt: Proteinkinase B; AMPK: AMP-aktivierte Proteinkinase; ATP: Adenosinriphosphat; cAMP: zyklisches Adenosinmonophosphat; cGMP: zyklisches Guanosinmonophosphat; DPP-IV: Dipeptidylpeptidase-IV; eNOS: endotheliale NO-Synthase; GLP-1: *glucagon-like peptide* 1; LKB1: Leber Kinase B1; NO: Stickstoffmonoxid; PI3-K: Phosphoinositid-3-Kinase; PKA: Proteinkinase A). Die schwarzen Pfeile repräsentieren Ausschnitte in der Literatur bekannter Signalkaskaden bzw. Stoffwechselwege. Selbsterstelltes Schema basierend auf Zhong *et al.* (228).

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Obwohl die Therapie der PH in der jüngeren Vergangenheit massive Fortschritte zu verbuchen hatte, stellt die PH auch heute noch eine unheilbare Krankheit dar (229), deren verschiedene Therapieansätze nach wie vor hauptsächlich durch eine Applikation primär vasodilatorisch wirksamer Substanzen im Sinne einer medikamentösen Symptomkontrolle charakterisiert sind (48).

Das Ziel dieser Arbeit besteht darin, einen möglichen Grundstein für eine kausal ausgelegte Therapie der PH mittels GLP-1R Agonisten zu evaluieren. Im Vordergrund steht hierbei die anti-proliferative und anti-inflammatorische Potenz von Exendin-4 (215), welche sich bei den bisher etablierten Substanzen zur Behandlung der PH lediglich als Nebeneffekt findet (48). Insbesondere in experimentellen Modellen zur Pathogenese der Arteriosklerose (210) und der Neointima-Formation nach künstlich gesetzter Gefäßläsion (215) (230) ist besagte Potenz von Exendin-4 mehrfach verifiziert worden. Weil die Ausbildung arteriosklerotischer Plaques bzw. einer Neointima und die für die PH typische Neomuskularisation im Sinne eines *Remodeling* zumindest in ihren Grundzügen identische Charakteristika zeigen (unkontrollierte Zellproliferation und/oder -migration in Kombination mit inflammatorischen Prozessen), erscheint eine mögliche Therapie der PH mit GLP-1R Agonisten durchaus als sinnvoll.

Für die mögliche Etablierung einer solchen Therapie der PH mit dem GLP-1R Agonisten Exendin-4 (Exenatid) wurde in der vorliegenden Arbeit mittels immunhistochemischer Methoden untersucht, ob GLP-1 und GLP-1R auf pulmonalvaskulären Strukturen exprimiert werden und ob ggf. Unterschiede bezüglich der Expression zwischen gesunden Lungen, IPAHLungen, CTEPH-Lungen und einem Modell der MCT-induzierten PH bei Ratten bestehen.

In der Zellkultur sollte ferner ein anti-proliferativer Effekt von Exendin-4 auf die FCS-induzierte Proliferation von aus MCT-Rattenlungen isolierten PASMCs nachgewiesen werden.

Die zentrale Hypothese besteht hierbei in der Annahme, dass die Expression sowohl von GLP-1 als auch von GLP-1R in Lungen von an PH erkrankten Individuen reduziert ist.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Labortechnische Apparaturen & Instrumente

Histologie

Abzug TA1800	<i>Laborbau-Systeme Hemling GmbH & Co. KG, Ahaus, Deutschland</i>
Automatische Pipetten 1-10µl, 10-100µl (Eppendorf <i>PhysioCare concept</i>)	<i>Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland</i>
Brutschrank	<i>Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland</i>
Gewebeinfiltrationsautomat Leica TP1050	<i>Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland</i>
Feinwaage Mettler PL303	<i>Mettler Toledo, Giessen, Deutschland</i>
Heizplatte Leica Hi 1220	<i>Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland</i>
Kühlplatte Leica EG 1150 C	<i>Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland</i>
Lichtmikroskop Leica DMLA	<i>Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland</i>
Mikroskopkamera Leica DFC310 FX	<i>Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland</i>
Mikrotom RM 2255	<i>Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland</i>
Magnetrührer IKA® RH basic 2	<i>IKA GmbH, Staufen, Deutschland</i>
Paraffinausgießstation Leica EG 1140 H	<i>Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland</i>
pH-Meter 766 <i>Calimatic</i>	<i>Knick GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland</i>
Pinzetten	<i>Bochem Instrumente GmbH, Weilburg, Deutschland</i>
Reinstwasseranlage Milli-Q®	<i>Millipore, Schwalbach, Deutschland</i>
Schüttelgerät IKA® Vibrax VXR <i>basic</i>	<i>IKA GmbH, Staufen, Deutschland</i>
Tischzentrifuge Hettich Mikro 200R	<i>Hettich-Zentrifugen GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland</i>
Vortexer MS1 <i>Minishaker</i>	<i>IKA GmbH, Staufen, Deutschland</i>
Wasserbad Leica HI 1210	<i>Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland</i>

Zellkultur

Spektralphotometer <i>Infinite M200</i>	<i>TECAN Deutschland GmbH, Crailsheim, Deutschland</i>
Sterile Werkbank	<i>Integra Biosciences GmbH, Fernwald, Deutschland</i>
Zellinkubator <i>HERAcell 150</i>	<i>Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA</i>
Zellkultur-Mikroskop <i>Leica DM IL</i>	<i>Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland</i>

2.1.2 Chemikalien, Reagenzien & Substanzen

Histologie

<i>Blocking Reagent</i>	<i>Zytomed Systems GmbH, Berlin, Deutschland</i>
BSA	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland</i>
Citratpuffer	<i>Zymed Laboratories Inc., Invitrogen, Carlsbad, CA, USA</i>
Desinfektionslösung (Sterilium® <i>classic pure</i>)	<i>BODE Chemie GmbH & Co. KG, Hamburg, Deutschland</i>
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$)	<i>Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland</i>
Eisen-Haematoxylin A, nach Weigert	<i>Waldeck GmbH & Co. KG, Münster, Deutschland</i>
Eisen-Haematoxylin B, nach Weigert	<i>Waldeck GmbH & Co. KG, Münster, Deutschland</i>
Eosin-y-alkoholisch	<i>Thermo Scientific, Rockford, IL, USA</i>
Ethanol, 70 %	<i>SAV-Liquid Production GmbH, Flintsbach, Deutschland</i>
Ethanol, 96 %	<i>Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken, Deutschland</i>
Ethanol absolut, 99,6 %	<i>Berkel AHK Alkoholhandel GmbH & Co. KG, Ludwigshafen, Deutschland</i>
Formalin (Formaldehyd-Lösung 3,5-3,7 %)	<i>Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken, Deutschland</i>
Hämalaun, sauer; nach Meyer	<i>Waldeck GmbH & Co. KG, Münster, Deutschland</i>

Hämatoxylin (QS H-3404)	<i>Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA</i>
Isopropylalkohol 99,8 %	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland</i>
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	<i>Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland</i>
Kaliumchlorid (KCl)	<i>Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland</i>
Methanol	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland</i>
Methylgrün (H-3402)	<i>Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA</i>
Monocrotalin (<i>Crotaline</i> ®)	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland</i>
Natriumazid (NaN_3)	<i>Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland</i>
Natriumchlorid (NaCl)	<i>Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland</i>
Natriumhydroxid (NaOH)	<i>Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland</i>
<i>Normal Horse Serum 2,5 %</i>	<i>Alexis Biochemicals, Grünberg, Deutschland</i>
Paraffin (Paraplast Plus®)	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland</i>
Pertex® (Eindeckmedium)	<i>Medite GmbH, Burgdorf, Deutschland</i>
Proteinase K (Dako <i>Real</i> ™, 40x)	<i>Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark</i>
Resorcin-Fuchsin; nach Weigert	<i>Waldeck GmbH & Co. KG, Münster, Deutschland</i>
<i>Rodent Block R</i>	<i>Zytomed Systems GmbH, Berlin, Deutschland</i>
Salzsäure (HCl)	<i>Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland</i>
TBS-Tris Puffer pH 7,2	<i>Zytomed Systems GmbH, Berlin, Deutschland</i>
Trypsin (<i>Digest All2</i> ®)	<i>Invitrogen Corporation, Camarillo, CA, USA</i>
Wasserstoffperoxid (H_2O_2), 30 %	<i>Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland</i>
Xylol (Roti®-Histol)	<i>Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland</i>

Zellkultur

Exendin-4 (ab120214)	<i>Abcam Inc., Cambridge, UK</i>
FCS	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland</i>
Medium 199 (M199)	<i>Life Technologies, Darmstadt, Deutschland</i>
Penicillin/Streptomycin (P/S)	<i>Life Technologies, Darmstadt, Deutschland</i>
Zell-Proliferation ELISA, BrdU Colorimetric Kit	<i>Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, Deutschland</i>

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Histologie

Deckgläser 24x36 mm	<i>Menzel GmbH & Co. KG, Braunschweig, Deutschland</i>
Eppendorf Tubes (<i>Microtubes</i> 1,5 ml)	<i>Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland</i>
Gewebe-Einbettkassetten	<i>Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland</i>
Handschuhe Nitra-Tex®	<i>Ansell Ltd., Tamworth, Staffordshire, UK</i>
Mikrotomklingen (MX35 Premier 34°/80 mm)	<i>Thermo Scientific, Rockford, IL, USA</i>
Objektträger 25x75x1 mm (SuperFrost Ultra Plus®)	<i>R. Langenbrinck, Emmedingen, Deutschland</i>
Pipettenspitzen für automatische Pipetten 10 µl, 200 µl, 1000 µl	<i>Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland</i>
Präparatemappen	<i>R. Langenbrinck, Emmedingen, Deutschland</i>
Präparatekästen	<i>R. Langenbrinck, Emmedingen, Deutschland</i>

Zellkultur

Handschuhe Nitra-Tex®	<i>Ansell Ltd., Tamworth, Staffordshire, UK</i>
Zellkulturflaschen	<i>Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland</i>
Zellkulturplatten (24-Well-Platten)	<i>Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland</i>
Zellkulturschalen	<i>Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland</i>

2.1.4 Puffer, Medien & Lösungen

Tabelle 4: Verwendete Puffer, Medien und Lösungen.

Puffer	Substanz	Menge
PBS, 20x (Immunhistochemie)*	NaCl	160 g
	KCl	4 g
	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	23 g
	KH ₂ PO ₄	4 g
	dH ₂ O	1 L
Medium	Substanz	Verhältnis
Wachstumsmedium (Zellkultur)	Medium 199	als Basis
	FCS	10 %
	P/S	1 %
Hungermedium (Zellkultur)	Medium 199	als Basis
	FCS	0,1 %
	P/S	1 %
Lösung	Substanz	Menge
BSA, 1 % (Immunhistochemie)	BSA	0,5 g
	NaN ₃	0,0065 g
	PBS, 1x	50 ml
BSA, 10 % (Immunhistochemie)	BSA	20 g
	NaN ₃	0,026 g
	PBS, 1x	200 ml
Fe-Hämatoxylin nach Weigert (EvG-Färbung)	Eisen-Hämatoxylin A, nach Weigert	100 ml
	Eisen-Hämatoxylin B, nach Weigert	100 ml
H ₂ O ₂ -Methanol Gemisch 15 % (Immunhistochemie)	Methanol, reinst	100 ml
	H ₂ O ₂ , 30 %	100 ml

* vor Gebrauch ist eine Verdünnung zu einfach konzentriertem PBS-Puffer (PBS 20x → PBS 1x) durch Zugabe von dH₂O sowie ggf. Korrektur des pH-Wertes durch Zugabe von HCl bzw. NaOH auf pH = 7,4 mittels pH-Meter erforderlich.

2.1.5 Verwendete Antikörper für die Immunhistochemie

Anti-GLP-1R Antikörper (ab39072) (Polyklonal, Kaninchen anti Ratte/Mensch)	<i>Abcam Inc., Cambridge, UK</i>
Anti-GLP-1 Antikörper (bs-0038R) (Polyklonal, Kaninchen anti Ratte/Mensch)	<i>Bioss Inc., Woburn, MA, USA</i>
Anti- α -SMA Antikörper (A 2547) (Monoklonal, Maus anti Ratte/Mensch)	<i>Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland</i>
Anti-vWF Antikörper (A 0082) (Polyklonal, Kaninchen anti Ratte/Mensch)	<i>Dako Cytomation, Hamburg, Deutschland</i>

2.1.6 Kits & Assays

DAB (Substrat <i>Kit</i> für Peroxidase)	<i>Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA</i>
ImmPRESS™ Reagent <i>Kit</i> Peroxidase	<i>Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA</i>
Universal <i>Quick Kit</i> (PK-7800)	<i>Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA</i>
Vector®VIP-(Substrat <i>Kit</i>) Reagenz	<i>Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA</i>
Warp RED Chromogen <i>Kit</i> (Substrat)	<i>Biocare Medical, Concord, CA, USA</i>
ZytoChem-Plus AP Polymer- <i>Kit</i>	<i>Zytomed Systems GmbH, Berlin, Deutschland</i>

2.1.7 Computerprogramme

GraphPad <i>Prism</i> ® Version 5.01	<i>GraphPad Software, Inc., USA</i>
Leica QWin V3	<i>Leica Microsystems Ltd., Schweiz</i>

2.1.8 Probenmaterial

Histologie

Die Untersuchungsbasis für den histologischen Teil bildete bereits in Formalin fixiertes und in Paraffin eingebettetes (FFPE) Gewebe. Für die Untersuchungen an Humangeewebe wurden gesundes Lungengewebe („Donor“, n = 12), Lungengewebe von Patienten mit idiopathischer pulmonaler Hypertonie (IPAH), früher bezeichnet als primäre pulmonale Hypertonie (daher die Deklaration als „PPH“, n = 12) sowie Lungengewebe von Patienten mit chronisch thromboembolischer pulmonaler Hypertonie („CTEPH“, n = 10) verwendet. Die Gegenüberstellung unter Verwendung eines Rattenmodells setzte sich aus Lungengewebe gesunder Ratten („Healthy“, n = 10) sowie Lungengewebe von Ratten entnommen 5 Wochen nach einmaliger MCT-Injektion („MCT“, n = 12) zusammen. MCT diente hierbei der artifiziellen Induktion einer PH in den Ratten und stellt ein inzwischen gut validiertes Tiermodell dar. Als Positivkontrolle in Bezug auf die GLP-1/GLP-1R Immunhistochemie fungierte Gewebe von Dünndarm (*Intestinum tenue*) und Gaumenmandel (*Tonsilla palatina*), jeweils einmal humanen Ursprungs und einmal von der Ratte. Lässt man die Positivkontrollen unberücksichtigt, so ergibt sich ein Gesamtstichprobenumfang von n = 56 (**Tabelle 5**).

Ethikkommission und Tierschutz

Da es sich bei allen Gewebeproben um Material aus der BIOBANK handelte, war ein positives Votum der Ethikkommission - ebenso wie eine Tierversuchsgenehmigung des Tierschutzbeauftragten - nicht erforderlich bzw. es hatten die für die ursprünglich durchgeführten Untersuchungen beantragten Dokumente noch ihre Gültigkeit. Die Analyse des Patientengewebes war demnach unter dem Aktenzeichen 10/06 (Ergänzung zum Antrag 31/93) durch die Ethikkommission des Fachbereiches Humanmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen genehmigt, die Einbeziehung des tierischen Gewebes in den Versuch erfolgte mit der Genehmigung des Regierungspräsidiums Gießen unter dem Aktenzeichen GI 20/10 Nr. 39/2009.

Zellkultur

Als Probenmaterial für das Zellkultur-Experiment dienten PSMCs, welche aus Ratten isoliert wurden, in denen zuvor durch MCT eine PH induziert worden war. Hierzu wurde die von Dahal *et al.* beschriebene Technik verwendet (231).

Tabelle 5: Probenmaterial für die immunhistochemische Untersuchung.

Nr.	Donor	PPH	CTEPH	Healthy	MCT
(01)	Donor 58-10	PPH 56-5	CTEPH 6-9	<i>Healthy</i> - TB 2128	MCT 1 - 25.06.2008
(02)	Donor 64-9	PPH 74-11	CTEPH 41-4	<i>Healthy</i> - TB 2243	MCT 1 - Dez 2008
(03)	Donor 68-2	PPH 78-1	CTEPH 53-8	<i>Healthy</i> - TB 2247	MCT 2 - Dez 2008
(04)	Donor 68-10	PPH 94-5	CTEPH 67-6	<i>Healthy</i> - TB 2530	MCT 2 - Sept 2008
(05)	Donor 93-4	PPH 112-10	CTEPH 70-1	<i>Healthy</i> - TB 2531	MCT 3 - Dez 2008
(06)	Donor 95-7	PPH 113-5	CTEPH 91-1	<i>Healthy</i> - TB 3072	MCT 3 - Sept 2008
(07)	Donor 99-5	PPH 123-4	CTEPH 145-4	<i>Healthy</i> - TB 3075	MCT 5 - Sept 2008
(08)	Donor 107-3	PPH 125-6	CTEPH 160-7	<i>Healthy</i> 1 - Jun 2008	MCT 6 - Dez 2008
(09)	Donor 120-9	PPH 224-8	CTEPH-W 29-7	<i>Healthy</i> 3 - Nov 2008	MCT 8 - Dez 2008
(10)	Donor 198-6	PPH 225-3	CTEPH-W 35-3	<i>Healthy</i> 5 - Nov 2008	MCT 10 - Dez 2008
(11)	Donor 200-9	PPH-W 25-5			MCT 12 - Dez 2008
(12)	Donor-GI 150-16	PPH-W 37-5			MCT 13 - Dez 2008
Σ	n=12	n=12	n=10	n=10	n=12

2.2 Methoden

2.2.1 Herstellung eines histologischen Präparates

Die Lagerung des FFPE-Gewebes erfolgte im Kühlschrank. Etwa ½ Stunde vor Arbeitsbeginn wurden die zu schneidenden Blöcke auf eine Kühlplatte gelegt, da ausreichend gekühlte Blöcke eine Grundvoraussetzung für ein zufriedenstellendes Schnittergebnis darstellen. Nach dem Trimmen mit 20 µm Schnittdicke zwecks Schaffung einer planen Oberfläche wurden von jedem Gewebeblock 10 Serienschnitte zu je 3 µm Dicke angefertigt. Mittels Pinsel erfolgte die Überführung ins Wasserbad (40 °C) und nach dem Aufziehen auf vorbeschriftete Objektträger begann der Trocknungsprozess für zunächst ca. 2 Stunden auf der Heizplatte (42 °C), welcher anschließend im Brutschrank über Nacht bei 37 °C fortgeführt wurde. Waren die Präparate vollständig getrocknet, konnte die Weiterverarbeitung im Sinne des Färbeprozesses beginnen.

2.2.2 Konventionelle histologische Färbungen

Vor Färbebeginn mussten die Schnitte für mindestens eine Stunde im Brutschrank inkubiert werden, in welchem bei 59 °C das Paraffin schmolz. Das Grundprinzip konventioneller histologischer Färbungen gliedert sich in fünf Teilabschnitte (6):

Xylol ❶ dient der Entparaffinierung der Schnitte, die sich anschließende absteigende Alkoholreihe ❷ der Überführung in ein wässriges Milieu (Rehydratation). Es folgt die eigentliche Färbung in den für die jeweilige Färbung spezifischen Färbelösungen ❸. Eine aufsteigende Alkoholreihe zum Zwecke der erneuten Dehydratation ❹ sowie nachfolgend Xylol ❺ vervollständigen den Färbeprozess. Das abschließende Eindecken mittels Pertex oder Corbit-Balsam und Deckglas macht die gefärbten Schnitte haltbar.

Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Aufgrund der Tatsache, dass sich die HE-Färbung in der zytologisch-histologischen Untersuchung als Routinefärbung etabliert hat (6), wurde von den angefertigten Schnitten je ein Schnitt pro Gewebeblock mit dieser Färbetechnik behandelt (**Tabelle 6a**). Durch Verwendung des Hämaluns erfahren alle sauren (*basophilen*) Strukturen der Zelle eine Blaufärbung; dies gilt insbesondere für Zellkerne (*Nuclei*) inkl. der darin enthaltenen DNA sowie für das mit Ribosomen besetzte rER (6).

Eosin hingegen färbt alle basischen (*eosinophilen*) Zellbestandteile rot; wie bspw. zytosolisch lokalisierte Proteine, Mitochondrien, das gER und diverse Kollagene (6).

Tabelle 6: Färbeprotokolle der konventionellen histologischen Färbungen.

a) Färbeprotokoll der HE-Färbung		
Lfd. Nr.	Reagenz/Chemikalie	Dauer
(1)	Xylol	10 min
(2)	Xylol	10 min
(3)	Xylol	10 min
(4)	Ethanol absolut 99,6 %	5 min
(5)	Ethanol absolut 99,6 %	5 min
(6)	Ethanol 96 %	5 min
(7)	Ethanol 70 %	5 min
(8)	dH ₂ O	spülen
(9)	Hämalaun nach Mayer, sauer	20 min
(10)	H ₂ O, fließend	5 min
(11)	Ethanol 96 %	1 min
(12)	Eosin-y-alkoholisch	4 min
(13)	dH ₂ O	spülen
(14)	Ethanol 96 %	2 min
(15)	Ethanol 96 %	2 min
(16)	Ethanol absolut 99,6 %	3 min
(17)	Isopropylalkohol 99,8 %	3 min
(18)	Xylol	3 min
(19)	Xylol	3 min
(20)	Xylol	3 min
Eindecken mit Pertex		

b) Färbeprotokoll der EvG-Färbung		
Lfd. Nr.	Reagenz/Chemikalie	Dauer
(1)	Xylol	10 min
(2)	Xylol	10 min
(3)	Xylol	10 min
(4)	Ethanol absolut 99,6 %	5 min
(5)	Ethanol absolut 99,6 %	5 min
(6)	Ethanol 96 %	5 min
(7)	Ethanol 70 %	5 min
(8)	Resorcin-Fuchsin	10-24 h
(9)	H ₂ O, fließend	15 min
(10)	dH ₂ O	spülen
(11)	Fe-Hämatoxylin nach Weigert	5 min
(12)	dH ₂ O	spülen
(13)	H ₂ O, fließend	15 min
(14)	dH ₂ O	spülen
(15)	Van Gieson-Lösung	10 min
(16)	dH ₂ O	spülen (kurz)
(17)	Ethanol 96 %	2 min
(18)	Ethanol 96 %	2 min
(19)	Ethanol absolut 99,6 %	3 min
(20)	Isopropylalkohol 99,8 %	3 min
(21)	Xylol	3 min
(22)	Xylol	3 min
(23)	Xylol	3 min
Eindecken mit Pertex		

Bei jeder histologischen Färbung - gleich ob konventioneller oder immunhistochemischer Natur - ging Schritt (1) unmittelbar vor Färbegbeginn eine mindestens einstündige Inkubation im Brutschrank bei 59 °C voraus.

Elastica-van-Gieson-Färbung

Zur besseren Differenzierung des physiologischen Gefäßaufbaus bzw. des pathologischen Gefäßumbaus (*Remodeling*) wurde ebenfalls ein Schnitt pro Gewebeblock mit der EvG-Färbung, einer Kombination aus der klassischen van Gieson-Methodik mit der Elastica-Färbung nach Weigert (6), gefärbt (**Tabelle 6b**). Das Färbeergebnis sieht bei dieser Färbung blauschwarze Nuclei, schwarzviolette elastische Fasern, gelbes Muskelgewebe und rote Kollagenfasern vor (6).

2.2.3 Immunhistochemische Färbungen

Immunhistochemische Methoden stellen eine Weiterentwicklung der konventionellen histologischen Untersuchungstechniken dar (6). Sie erlauben es, hochselektiv v.a. Proteinstrukturen sichtbar zu machen (6). Dies gelingt durch eine (im Idealfall) hochspezifische Antigen-Antikörper-Bindung (6).

Nähere Einzelheiten zur Theorie der Immunhistochemie anhand eines visualisierenden Schemas sind in **Abbildung 18 (Anhang)** aufgeführt.

GLP-1R und GLP-1 auf Humangewebe

Vor der eigentlichen Färbung (**Tabelle 7**) wurde anhand von Probeschnitten in einer aufsteigenden Verdünnungsreihe die optimale Konzentration des Primärantikörpers ermittelt. Als geeignet erwies sich eine Verdünnung von 1:100 für den GLP-1R-Ak bzw. eine Verdünnung von 1:300 für den GLP-1-Ak. Die Verwendung der *Kits* erfolgte streng nach Herstellerangaben.

Tabelle 7: Färbeprotokoll der GLP-1R und GLP-1 Immunhistochemie auf Humangewebe.

Nr.	Reagenz/Chemikalie	Dauer
(1)	Xylol	10 min
(2)	Xylol	10 min
(3)	Xylol	10 min
(4)	Ethanol absolut 99,6 %	5 min
(5)	Ethanol absolut 99,6 %	5 min
(6)	Ethanol 96 %	5 min
(7)	Ethanol 70 %	5 min
(8)	dH ₂ O	2x5 min
(9)	Kochen (Mikrowelle)	25 min
	Warmhalten in Puffer (Mikrowelle aus)	10 min
	Kühlen in Puffer (Küvette offen)	30 min
(10)	dH ₂ O	1 min
(11)	H ₂ O ₂ -Methanol Gemisch 15 %	20 min
(12)	dH ₂ O	2x5 min
(13)	Proteinase K	15 min
(14)	dH ₂ O	1 min
(15)	TBS-Tris Puffer pH 7,2	2x5 min
(16)	10 % BSA-Lösung	60 min
(17)	PBS Puffer pH 7,4	2x5 min
(18)	<i>Blocking Reagent</i>	10 min
(19)	TBS-Tris Puffer pH 7,2	2 min
(20)	Primärantikörper	über Nacht
(21)	TBS-Tris Puffer pH 7,2	4x5 min/2h
(22)	<i>Post Block Reagent 2</i> (ZytoChem-Plus AP Polymer Kit)	20 min
(23)	TBS-Tris Puffer pH 7,2	3x5 min
(24)	<i>AP-Polymer Reagent 3</i> (ZytoChem-Plus AP Polymer Kit)	30 min
(25)	TBS-Tris Puffer pH 7,2	3x5 min
(26)	<i>Warp Red Chromogen Kit</i> (Substrat)	10 min
(27)	dH ₂ O	spülen
(28)	Hämatoxylin	30 sec - 5 min
(29)	dH ₂ O	spülen
(30)	TBS-Tris Puffer pH 7,2	1 min
(31)	H ₂ O	10 min
(32)	Ethanol absolut 99,6 %	30 sec
(33)	Ethanol absolut 99,6 %	30 sec
(34)	Ethanol absolut 99,6 %	30 sec
(35)	Xylol	30 sec
(36)	Xylol	30 sec
Eindecken mit Pertex		

Das Färbeprotokoll ist für GLP-1R und GLP-1 prinzipiell identisch. Ein Unterschied besteht lediglich in der Verwendung des jeweiligen Primärantikörpers [Schritt (20)]. Für die GLP-1R Immunhistochemie erfolgte die Verwendung des GLP-1R Primärantikörpers (Verdünnung 1:100); für die GLP-1 Immunhistochemie die Verwendung des GLP-1 Primärantikörpers (Verdünnung 1:300).

GLP-1R und GLP-1 auf Rattengewebe

Auch für die Immunhistochemie auf Rattengewebe (**Tabelle 8**) erfolgte eine Testung der optimalen Verdünnung des Primärantikörpers; diese lag für den GLP-1R-Ak ebenfalls bei 1:100 und für den GLP-1-Ak bei 1:200. Alle *Kits* wurden streng nach Herstellerangaben verwendet. Die Zielstrukturen GLP-1R bzw. GLP-1 färbten sich sowohl auf Humangewebe (s.o.) als auch auf Rattengewebe rot an.

Tabelle 8: Färbeprotokoll der GLP-1R und GLP-1 Immunhistochemie auf Rattengewebe.

Nr.	Reagenz/Chemikalie	Dauer			
(1)	Xylol	10 min	(17)	PBS Puffer pH 7,4	2x5 min
(2)	Xylol	10 min	(18)	<i>Rodent Block R</i>	30 min
(3)	Xylol	10 min	(19)	TBS-Tris Puffer pH 7,2	2 min
(4)	Ethanol absolut 99,6 %	5 min	(20)	Primärantikörper	über Nacht
(5)	Ethanol absolut 99,6 %	5 min	(21)	TBS-Tris Puffer pH 7,2	4x5 min/2h
(6)	Ethanol 96 %	5 min	(22)	AP-Polymer <i>Reagent 3</i> (ZytoChem-Plus AP Polymer <i>Kit</i>)	30 min
(7)	Ethanol 70 %	5 min	(23)	TBS-Tris Puffer pH 7,2	3x5 min
(8)	dH ₂ O	2x5 min	(24)	<i>Warp Red Chromogen Kit</i> (Substrat)	10 min
(9)	Kochen (Mikrowelle)	25 min	(25)	dH ₂ O	spülen
	Warmhalten in Puffer (Mikrowelle aus)	10 min	(26)	Hämatoxylin	30 sec - 5 min
	Kühlen in Puffer (Küvette offen)	30 min	(27)	dH ₂ O	spülen
(10)	dH ₂ O	1 min	(28)	TBS-Tris Puffer pH 7,2	1 min
(11)	H ₂ O ₂ -Methanol Gemisch 15 %	20 min	(29)	H ₂ O	10 min
(12)	dH ₂ O	2x5 min	(30)	Ethanol absolut 99,6 %	30 sec
(13)	Proteinase K	15 min	(31)	Ethanol absolut 99,6 %	30 sec
(14)	dH ₂ O	1 min	(32)	Ethanol absolut 99,6 %	30 sec
(15)	TBS-Tris Puffer pH 7,2	2x5 min	(33)	Xylol	30 sec
(16)	10 % BSA-Lösung	60 min	(34)	Xylol	30 sec
Eindecken mit Pertex					

Das Färbeprotokoll ist für GLP-1R und GLP-1 prinzipiell identisch. Ein Unterschied besteht lediglich in der Verwendung des jeweiligen Primärantikörpers [Schritt (20)]. Für die GLP-1R Immunhistochemie erfolgte die Verwendung des GLP-1R Primärantikörpers (Verdünnung 1:100); für die GLP-1 Immunhistochemie die Verwendung des GLP-1 Primärantikörpers (Verdünnung 1:200).

Doppelfärbung: α -smooth muscle actin und vWF

Die α -Actin/vWF-Doppelfärbung (**Tabelle 9**) war in erster Linie für eine differenzierte Beurteilung der Lokalisation des GLP-1R in den pulmonalen Gefäßen notwendig, da sie eine präzise Unterscheidung von Endothel (*Intima*) und Muscularis (*Media*) erlaubt.

Tabelle 9: Färbeprotokoll der immunhistochemischen Doppelfärbung: α -Actin und vWF.

Nr.	Reagenz/Chemikalie	Dauer (min)
a) Färbung des ersten Antigens (α-Actin)		
(1)	Xylol	10
(2)	Xylol	10
(3)	Xylol	10
(4)	Ethanol absolut 99,6 %	5
(5)	Ethanol absolut 99,6 %	5
(6)	Ethanol 96 %	5
(7)	Ethanol 70 %	5
(8)	H ₂ O ₂ -Methanol Gemisch 15 %	20
(9)	dH ₂ O	2x5
(10)	PBS	2x5
(11)	Trypsin (37 °C)	15
(12)	PBS	4x5
(13)	10 % BSA	20
(14)	PBS	2x5
(15)	Serumblock I	10
(16)	Primärantikörper I	30
(17)	PBS	4x5
(18)	Sekundärantikörper, biotinyliert	10
(19)	PBS	4x5
(20)	Streptavidin Peroxidase Complex	5
(21)	PBS	4x5
(22)	VIP-(Substrat Kit) Reagenz	3-4
(23)	H ₂ O ₂	5
b) Färbung des zweiten Antigens (vWF)		
(24)	PBS	5
(25)	10 % BSA	20
(26)	PBS	2x5
(27)	Serumblock II	20
(28)	Primärantikörper II (37 °C)	30
(29)	PBS	4x5
(30)	Sekundärantikörper	30
(31)	PBS	2x5
(32)	DAB	20-25 sec
(33)	H ₂ O	5
(34)	Methylgrün	5
(35)	dH ₂ O	1
(36)	Ethanol 96 %	2
(37)	Ethanol 96 %	2
(38)	Isopropylalkohol 99,8%	5
(39)	Isopropylalkohol 99,8%	5
(40)	Xylol	5
(41)	Xylol	5
(42)	Xylol	5
Eindecken mit Pertex		

Als spezifischer Endothelzellmarker diene hierbei vWF (braunes Färbeargebnis); α -Actin als muskelspezifisches Protein hingegen repräsentiert einen Indikator der Muscularis (lila Färbeargebnis).

Die Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit Methylgrün. Der Ablauf der Doppelfärbung war für Rattengewebe und für Humangewebe identisch. Beide Teilfärbungen folgten unmittelbar aufeinander. Die Verdünnung der Primärantikörper betrug jeweils 1:800. Die Verwendung aller *Kits* erfolgte streng nach Herstellerangaben.

2.2.4 Quantifizierung der Immunhistochemie: *Scoring analysis*

Die Quantifizierung des immunhistochemischen Färbergebnisses erfolgte mittels *scoring analysis*. Hierfür wurde das *Scoring*-Programm der Leica QWin V3 Standard® Software verwendet. Die für das *Scoring*-Ergebnis wesentlichen Teilschritte werden ausführlich anhand von **Abbildung 19 (Anhang)** illustriert, weswegen es an dieser Stelle nur einer textlichen Kurzform als Beschreibung bedarf:

Nach Einstellung der Bildparameter (Grundvoraussetzung: Für jedes zu untersuchende Präparat identische Werte) wurde der Ort der maximalen Intensität im jeweils vorliegenden Schnitt aufgesucht und vom Programm gleich 100 % Färbeintensität (Referenzgrauwert) gesetzt. Anschließend begann die Messung von sowohl der Intensität als auch der Verteilung aller Rottöne des gesamten Präparates Bild für Bild. Die einzelnen Messergebnisse wurden von der Software automatisch in eine Excel-Datei transferiert und entsprechende Durchschnittswerte wurden gebildet. Der *score value* markierte hierbei den für diese Untersuchung entscheidenden Wert.

2.2.5 Zellkultur

Pulmonalarterielle glatte Muskelzellen (PASMCs) wurden gemäß Dahal *et al.* aus Ratten isoliert (231), in denen zuvor mittels MCT eine PH induziert worden war. Die PASMCs-Kulturen wurden bei 37 °C in einem befeuchteten Zellinkubator mit einer Atmosphäre aus 5 % CO₂ und 95 % O₂ kultiviert. In eine 24-Well-Platte wurden etwa 5×10³ Zellen pro *Well* ausgesät und nach 24 Stunden wurde das M199 Wachstumsmedium mit 10 % FCS durch ein Hungermedium (0,1 % FCS) ersetzt. Verschiedene Dosen von Exendin-4 (5 und 50 nM sowie 1 µM in H₂O) wurden den jeweiligen Versuchsgruppen hinzugefügt. Nach 24 Stunden Inkubation im Hungermedium erfolgte die Induktion der Zellproliferation mittels Wachstumsmedium plus den jeweiligen Dosen von Exendin-4 in den korrespondierenden Versuchsgruppen. 5-Brom-2'-Desoxyuridin (BrdU) *Labeling Reagent* wurde in jedes *Well* hinzugefügt. Während der sich anschließenden Inkubationszeit wurde das BrdU (ein Thymidin-Analagon) anstelle des Thymidins in die DNA proliferierender Zellen eingebaut. Am folgenden Tag wurde erfolgreich inkorporiertes BrdU durch Bindung an einen mit Peroxidase konjugierten

monoklonalen Antikörper identifiziert. Die Zellen wurden nachfolgend 3x mit 250 µl PBS-Puffer gewaschen und die gebildeten Immunkomplexe wurden durch die sich anschließende Substratreaktion detektiert. Die entstehende Farbe des Reaktionsproduktes wurde durch Messung der Absorption bei den jeweils spezifischen Wellenlängen (370 nm, Referenz: 492 nm) mittels Multi-Well-Spektralphotometer quantifiziert (**Tabelle 10**). Alle Experimente wurden in zweifacher Ausfertigung durchgeführt.

Tabelle 10: Protokoll des Zellkultur-Experiments.

Nummer	Korrespondierender Arbeitsschritt
(1)	Aussaat von $\sim 5 \times 10^3$ PASCs/Well in 24-Well-Platten mit 500 µl Wachstumsmedium/Well (10 % FCS/M199/1 % P/S).
(2)	Nach 24 Stunden Ersatz des Wachstumsmediums durch ein Hungermedium (0,1 % FCS/M199/1 % P/S) für 24 Stunden. Zugabe von Exendin-4 in Dosen von 5 und 50 nM sowie 1 µM zu den jeweiligen Gruppen.
(3)	Induktion der Zellproliferation durch Austausch des Hungermediums gegen 225 µl/Well Wachstumsmedium inklusive Exendin-4 in den jeweiligen Dosen. Zu den Kontrollgruppen wurden 225 µl Hungermedium/Well oder alternativ Wachstumsmedium ohne Exendin-4 zugefügt. Zusätzlich Zugabe von 25 µl von 100 µM BrdU <i>Labeling Reagent</i> in jedes Well.
(4)	Nach 24 Stunden Entfernung des Inkubationsmediums und Fixierung der Zellen durch Zugabe von 250 µl FixDenat/Well.
(5)	Inkubation der Platten für 30 Minuten bei Raumtemperatur.
(6)	Entfernen von FixDenat.
(7)	Zugabe von 250 µl anti-BrdU Antikörper konjugiert mit Peroxidase in jedes Well.
(8)	90 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur.
(9)	Entfernen der Lösung und dreimaliges Waschen mit 250 µl PBS-Puffer.
(10)	Hinzufügen von 250 µl Substrat/Well.
(11)	Nach 5 Minuten Inkubationszeit Messung der Absorption bei 370 nm (Referenz 492 nm) alle 5 Minuten bis zu 20 Minuten.

2.2.6 Statistische Auswertung

Die graphische Visualisierung der gewonnenen Rohdaten geschah in Form von Balkendiagrammen. Die Höhe der Balken repräsentiert hierbei die Mittelwerte, die Fehlerbalken hingegen stellen den SEM (*standard error of the mean*, Standardfehler) dar. Die Visualisierung erfolgte mittels GraphPad Prism® Version 5.01.

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte unter der Verwendung des Zweistichproben-t-Testes (*Student's t-Test*). Ein p-Wert $\leq 0,05$ wurde hierbei als statistisch signifikant angesehen.

3 ERGEBNISSE

Hirata *et al.* konnten 2013 - wie zuvor bereits Goto *et al.* in 2011 - zeigen, dass durch eine Applikation von Exendin-4 nach künstlich gesetzter Gefäßläsion in Mäusen die Bildung einer Neointima signifikant reduziert werden konnte (215) (230). Weiter wiesen Hirata *et al.* in einem Zellkultur-Experiment mit glatten Muskelzellen aus der Aorta von Ratten nach, dass das Inkretinanalogen auch *in vitro* sowohl anti-proliferative als auch anti-inflammatorische Potenz besitzt (215). Der Untersuchung zufolge kamen diese Eigenschaften durch einen der Aktivierung des *glucagon-like peptide 1 receptor* (GLP-1R) nachgeschalteten cAMP/PKA-Signalweg zustande (215). Da diese Eigenschaften einen Profit in der Therapie der PH versprechen, wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, inwiefern diese Erkenntnisse auf die Pathophysiologie eben jener Erkrankung übertragbar sind.

3.1 Lokalisation von *glucagon-like peptide 1 receptor* (GLP-1R) auf pulmonalvaskulären Strukturen

Um die Relevanz von *glucagon-like peptide 1* (GLP-1) bzw. dessen synthetischer Analoga als mögliche Therapieoption in der Behandlung der PH beurteilen zu können, musste zunächst festgestellt werden, ob insbesondere der GLP-1R als potenzielles therapeutisches *target* in Lungenparenchym exprimiert wird.

In einem weiteren Schritt sollte die exakte Lokalisation von GLP-1R speziell in dem Gewebe der pulmonalvaskulären Strukturen untersucht werden, sollte sich ein immunhistochemischer Nachweis von GLP-1R in Lungenparenchym initial bestätigen.

3.1.1 Lokalisation von GLP-1R in Humanlungen

In dem Parenchym humaner Lungen ließen sich v.a. pulmonalvaskuläre Strukturen immunhistochemisch anfärben. Des Weiteren färbten sich bisweilen sowohl der glattmuskuläre Anteil der Wand der größeren Bronchien (*Tunica fibromusculocartilaginea*) bzw. weniger der Bronchiolen als auch vereinzelte Zellen - vermutlich Alveolarmakrophagen oder andere Zellen inflammatorischer Differenzierung - rot. Auch einzelne Zellen des Bronchialepithels und insbesondere der Surfactant-Film reagierten manchmal positiv.

Das Maximum an Färbeintensität war jedoch definitiv stets den pulmonalvaskulären Strukturen zuzurechnen.

Die IPAH-Lungen präsentierten eine homogene, jedoch relativ schwache Anfärbbarkeit der Media mit allenfalls diskret stärkerer Expression von GLP-1R auf den Endothelzellen. Die CTEPH-Lungen hingegen wiesen hauptsächlich endothelständig eine besonders hohe Rezeptordichte bei gleichzeitig schwächerer Expression von GLP-1R auf den glatten Muskelzellen der Media auf (**Abbildung 10**). Für die CTEPH-Lungen war weiterhin eine erhöhte Rezeptordichte nahe der Grenze von Tunica media zu Tunica adventitia im Bereich der Membrana elastica externa charakteristisch. Die Differenzierung und Zuordnung der Expressionsintensitäten zu den jeweiligen histologischen Schichten einer Arterie geschah in Berücksichtigung der Korrelation des Ergebnisses der GLP-1R Immunhistochemie mit der EvG-Färbung und insbesondere der α -Actin/vWF-Doppelfärbung. Beide Färbungen erlaubten eine exakte Differenzierung von Endothelium und Muscularis und dienten somit als Referenz.

3.1.2 Lokalisation von GLP-1R in Rattenlungen

Auch in dem Parenchym der Rattenlungen dominierten die Gefäße als positiv reagierende Strukturen, jedoch waren ebenfalls - sogar in höherem Maße als bei den humanen Lungen - Bronchialepithel sowie Bronchialmuskulatur nebst einzelner Zellen vermutlich ebenfalls inflammatorisch differenzierter Subpopulation angefärbt worden. Bedingt durch die Tatsache, dass aufgrund der Größe der Rattenlungen regelmäßig die Pleuragrenze (Lungenfell, *Pleura visceralis*) mitangeschnitten war, konnte zudem eine erhöhte Expressionsdichte von GLP-1R unmittelbar subpleural festgestellt werden, wobei es sich jedoch vermutlich um ein Färbeartefakt handeln dürfte. Dem gleichen Umstand ist auch der Nachweis einer vermehrten Rotfärbung von Nerven, Skelettmuskulatur sowie von hyalinem Knorpel (letzterer wahrscheinlich unspezifisch analog zum Surfactant-Film) zu verdanken.

Besonders auffällig bei der GLP-1R Immunhistochemie war die starke und recht selektive Färbung des Endotheliums bei den MCT-Ratten, wohingegen die glatten Muskelzellen der Media nahezu ungefärbt blieben, wenngleich auch hier eine allerdings sehr schwache Expression nachgewiesen werden konnte (**Abbildung 10**). Die Lokalisationsbestimmung von GLP-1R auf pulmonalvaskulären Strukturen in der Rattenlunge fand ebenfalls in Korrelation zu den anderen Färbungen statt.

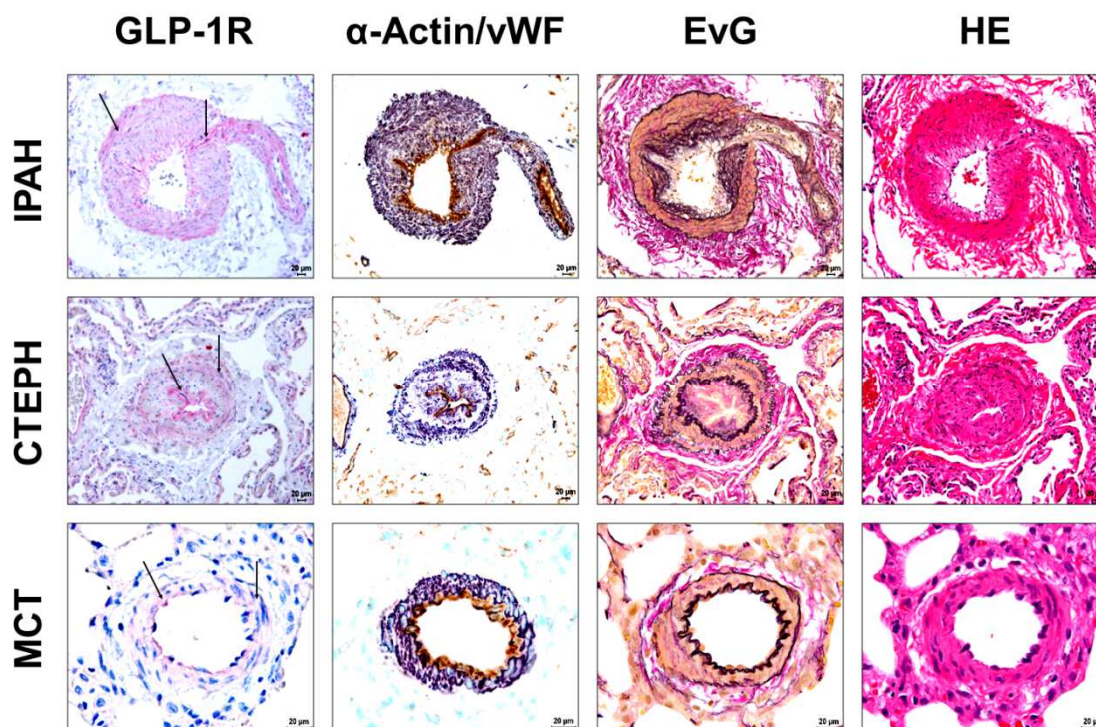


Abbildung 10: Immunhistochemische Lokalisation von GLP-1R.

Abgebildet sind Serienschritte. Jede Zeile verfolgt jeweils das gleiche Gefäß im Verlauf. Die Spalten hingegen repräsentieren die jeweils angewandte Färbung. Die Pfeile weisen auf die Orte höchster GLP-1R Expression hin. Diese fand sich sowohl bei den CTEPH-Lungen als auch bei den MCT-Lungen vorwiegend endothelständig, während die IPAH-Lungen durch eine gleichmäßige Färbung vor allem der Tunica media charakterisiert waren. Die Differenzierung von Endothel und Muscularis ist insbesondere der Korrelation zur immunhistochemischen α -Actin/vWF-Doppelfärbung geschuldet.

3.2 Expressionsprofil von GLP-1R

Der nächste Schritt, nachdem ermittelt worden war, *dass* sowie *wo* GLP-1R in pulmonalen Gefäßen exprimiert wird, bestand darin, mittels *scoring analysis* zu quantifizieren, *ob* und wenn ja *inwiefern* es objektiv messbare Unterschiede in der Expressionsintensität von GLP-1R zwischen Gefäßen gesunder Lungen und solchen von an PH Erkrankten gibt. Hierzu wurde die jeweilige Färbeintensität der GLP-1R Immunhistochemie gemessen und die Ergebnisse graphisch visualisiert.

Die Gegenüberstellung fand zwischen Donor-Lungen und IPAH-Lungen, Donor-Lungen und CTEPH-Lungen sowie gesunden Rattenlungen (*Healthy*) und einem MCT-Rattenmodell der PH statt.

3.2.1 Humanlungen: Donor vs. IPAH

Es zeigte sich eine deutlich verminderte Expression von GLP-1R in den IPAH-Lungen im Vergleich zu gesunden Donor-Lungen (**Abbildung 11**). Der Durchschnittswert (*score value* in %) der GLP-1R Expression für IPAH-Lungen betrug ~ 0,17 und für die Donor-Lungen ~ 0,30.

Die Färbung war bei beiden Präparaten ausgesprochen homogen und in den IPAH Lungen folglich gleichmäßig schwächer ausgeprägt als in den Donor-Lungen; d.h. bezüglich der Lokalisation des GLP-1R bestanden keine Differenzen, sondern lediglich bezüglich deren Expressionsintensität.

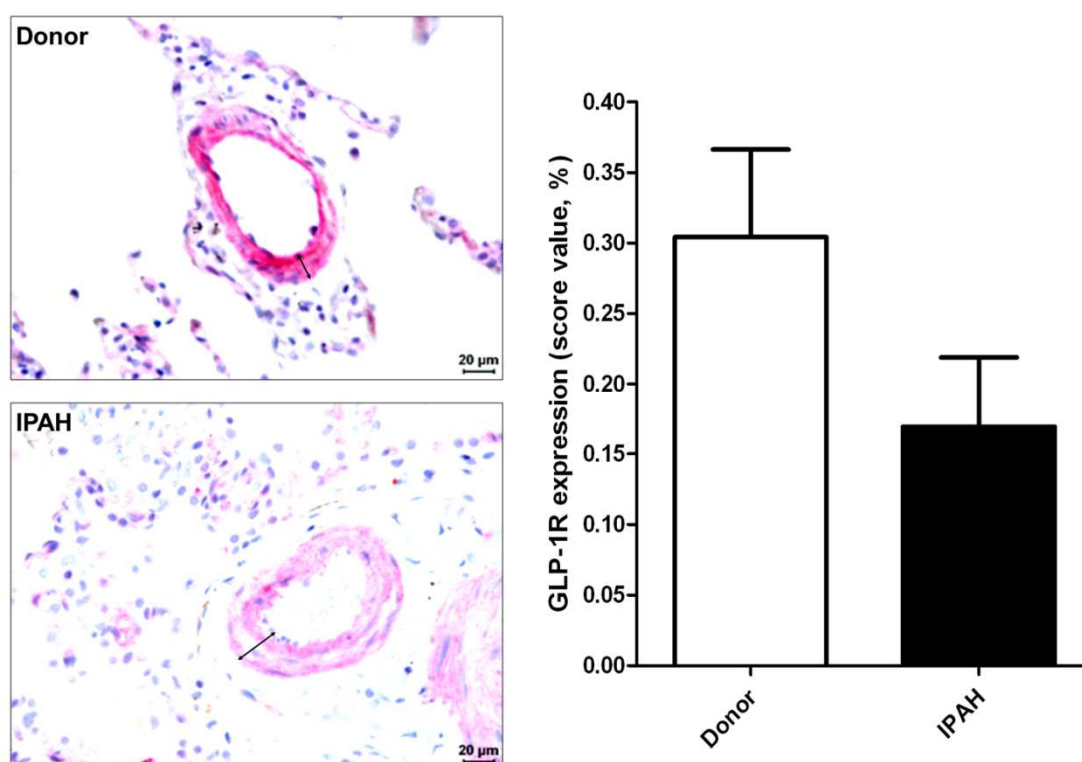


Abbildung 11: Vergleich des Expressionsprofils von GLP-1R auf pulmonalvaskulären Strukturen der humanen Lunge zwischen gesunden Lungen (Donor) und IPAH-Lungen.

Die GLP-1R Expression ist in den IPAH-Lungen (n=12) gegenüber den gesunden Donor-Lungen (n=12) deutlich reduziert. Die Mikrofotos stellen jeweils repräsentative Aufnahmen dar. Die Doppelpfeile definieren die Dicke der Gefäßwand. Die Gefäßwand der IPAH-Lunge zeigt die für die IPAH charakteristische Gefäßwandverdickung als Ergebnis des pathologischen *Remodeling*-Prozesses (hier jedoch sehr diskret ausgeprägt). Alle Daten sind als Mittelwert plus Standardfehler (SEM) angegeben.

3.2.2 Humanlungen: Donor vs. CTEPH

Die CTEPH-Lungen zeigten ebenfalls gegenüber den gesunden Donor-Lungen eine Verminderung der GLP-1R Expression (**Abbildung 12**). Diese fiel allerdings etwas geringer aus als es bei der Gegenüberstellung von IPAH-Lungen und Donor-Lungen der Fall war. Die korrespondierenden Wertepaare für den *score value* betrugen $\sim 0,30$ (Donor) und $\sim 0,22$ (CTEPH).

Die Donor-Lungen imponierten durch eine homogen kräftige Anfärbbarkeit von Endothel und Media, während die CTEPH-Lungen neben einer insbesondere endothelständig sehr hohen Rezeptordichte zusätzlich ein zweites Intensitätsmaximum nahe der Membrana elastica externa bei allenfalls sehr diskreter Anfärbbarkeit der restlichen Tunica media aufwiesen.

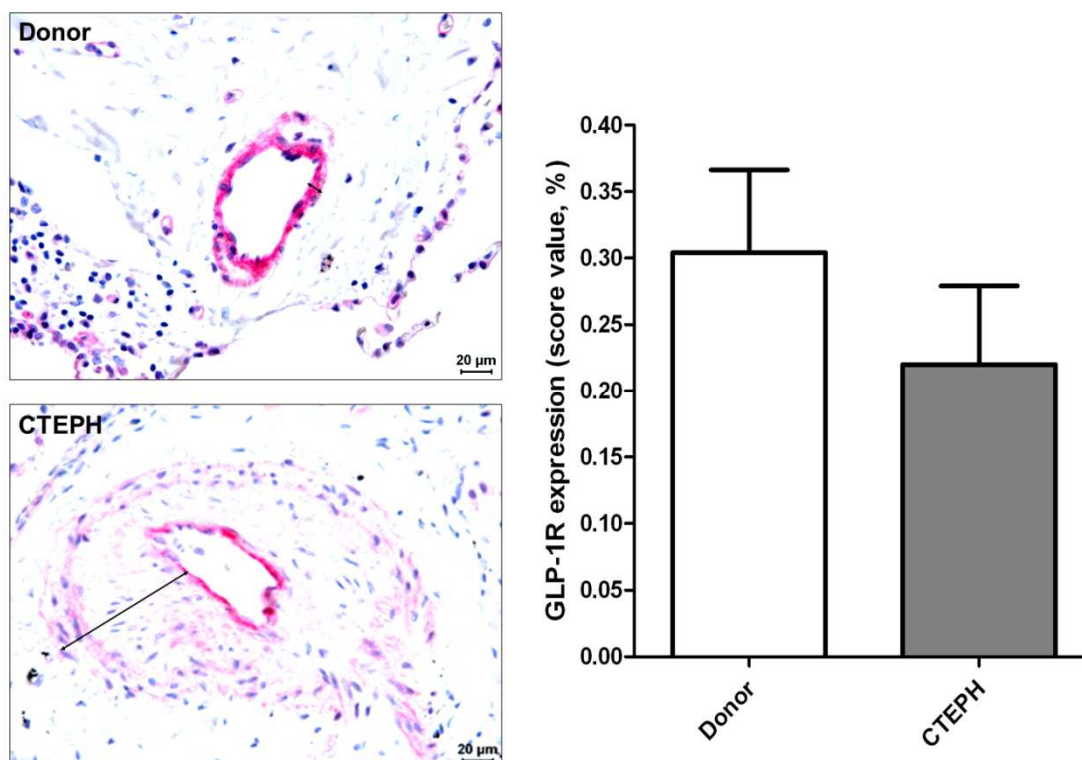


Abbildung 12: Vergleich des Expressionsprofils von GLP-1R auf pulmonalvaskulären Strukturen der humanen Lunge zwischen gesunden Lungen (Donor) und CTEPH-Lungen.

Die GLP-1R Expression ist in CTEPH-Lungen (n=10) gegenüber den gesunden Donor-Lungen (n=12) reduziert. Die Mikrofotos stellen jeweils repräsentative Aufnahmen dar. Die Doppelpfeile definieren die Dicke der Gefäßwand. Die Gefäßwand der CTEPH-Lunge zeigt eine massive Gefäßwandverdickung infolge des vermutlich durch rezidivierende Embolien induzierten Entzündungsprozesses mit konsekutivem *Remodeling* der Gefäßwand. Besonders gut zu erkennen ist ein zweiter Anstieg der Expressionsintensität im Bereich der Membrana elastica externa der CTEPH-Lunge. Alle Daten sind als Mittelwert plus Standardfehler (SEM) angegeben.

3.2.3 Rattenlungen: *Healthy control* vs. MCT

Die Gegenüberstellung im MCT-Rattenmodell ergab ein tendenziell identisches Verhältnis der Resultate: Die GLP-1R Expression in den MCT-Rattenlungen war signifikant geringer ausgeprägt als in den gesunden Kontrollen (**Abbildung 13**). Der *score value* betrug ~ 0,27 für die gesunden Kontrollen und ~ 0,16 für das Modell der MCT-induzierten PH in Ratten.

Beide Lungenschnitte reagierten insbesondere endothelständig positiv. Bei den MCT-Lungen war zusätzlich eine allenfalls sehr schwache Anfärbbarkeit der Media zu verzeichnen, was jedoch vermutlich auf deren pathomechanistisch bedingte Verbreiterung zurückzuführen war.

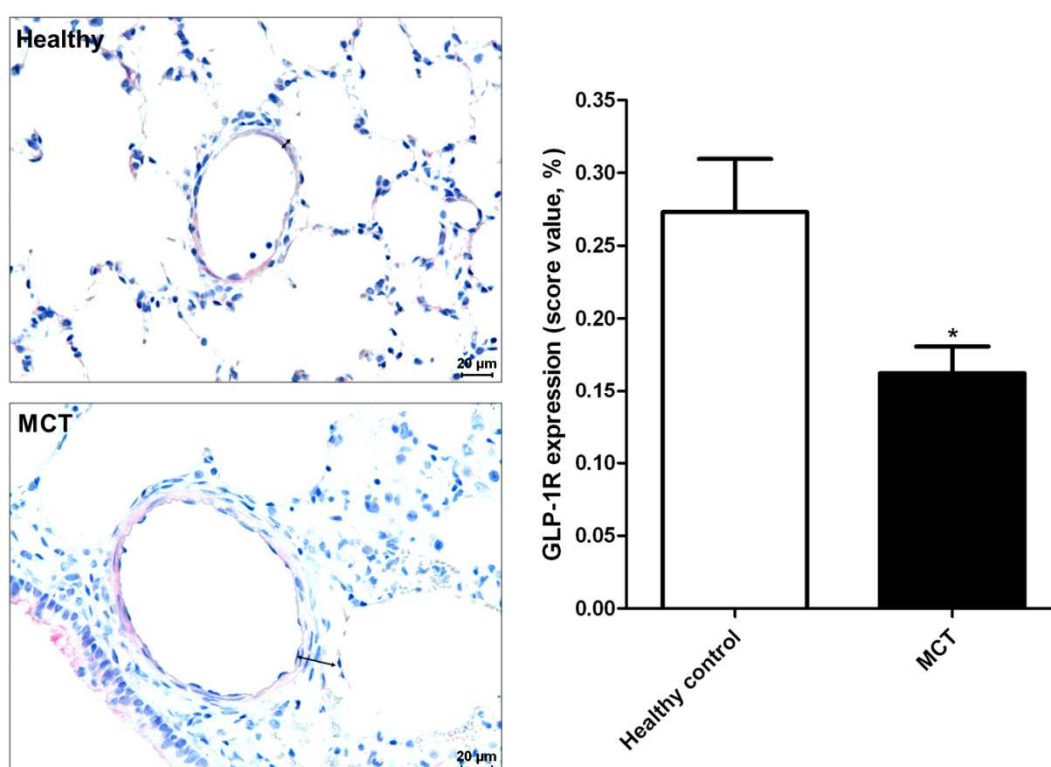


Abbildung 13: Vergleich des Expressionsprofils von GLP-1R auf pulmonalvaskulären Strukturen der Rattenlunge zwischen gesunden Lungen (*Healthy control*) und MCT-Lungen.

Die GLP-1R Expression ist in den MCT-Lungen (n=12) gegenüber den gesunden Kontrollen (n=10) signifikant reduziert. Die Mikrofotos stellen jeweils repräsentative Aufnahmen dar. Die Doppelpfeile definieren die Dicke der Gefäßwand. Die Gefäßwand der MCT-Lunge zeigt die für das Modell der MCT-induzierten PH charakteristische Wandverdickung als Ergebnis des *Remodeling*-Prozesses. Alle Daten sind als Mittelwert plus Standardfehler (SEM) angegeben. * Signifikante Unterschiede zu den gesunden Kontrollen.

3.3 Expressionsprofil von GLP-1

Mit der Analyse des GLP-1 Expressionsprofils wurde analog zu der Analyse des Expressionsprofils von GLP-1R verfahren. Die *score values* erreichten identische Tendenzen in Bezug auf die Differenzen zwischen den einzelnen Gruppen; die absoluten Beträge fielen jedoch wesentlich geringer aus als bei der Rezeptorexpression.

3.3.1 Humanlungen: Donor vs. IPAH

Das GLP-1 Expressionsprofil der IPAH-Lungen (*score value* ~ 0,02) war im Vergleich zu den Donor-Lungen (*score value* ~ 0,06) signifikant reduziert (**Abbildung 14**). Auffällig war die insgesamt nur sehr schwache GLP-1 Expression im Vergleich zu der seines Rezeptors. Bei den Donor-Lungen war sie bevorzugt endothelständig lokalisiert, die IPAH-Lungen hingegen reagierten im Bereich der peripheren Tunica media positiv.

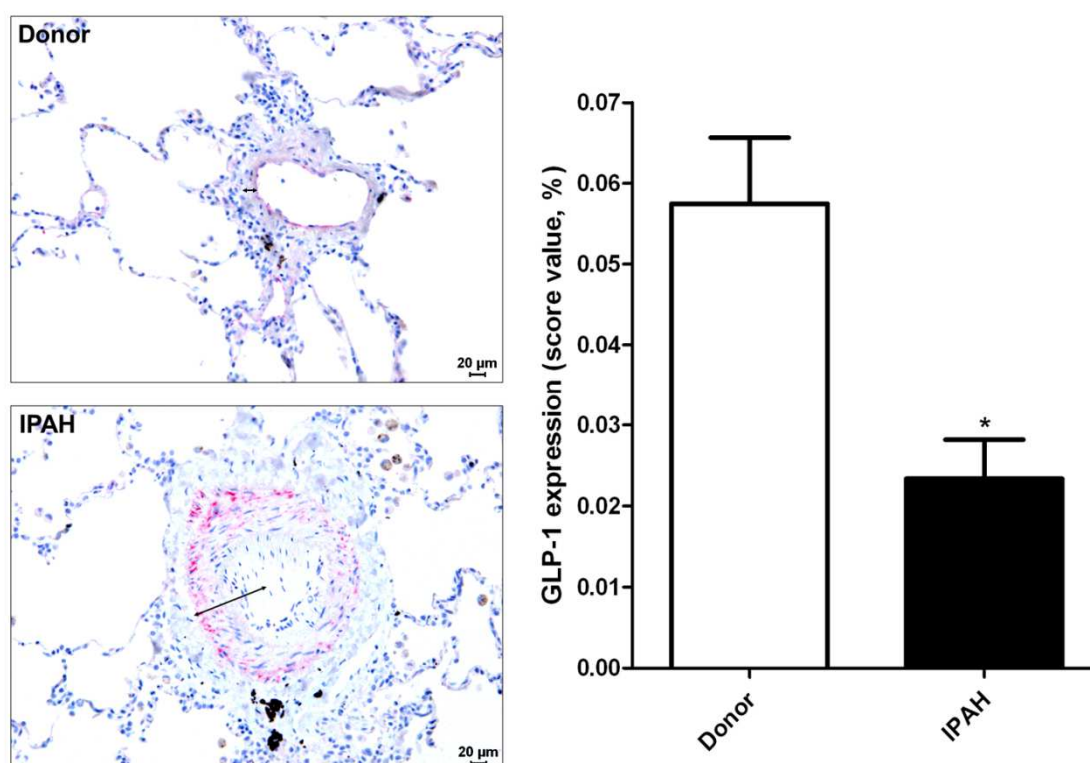


Abbildung 14: Vergleich des Expressionsprofils von GLP-1 auf pulmonalvaskulären Strukturen der humanen Lunge zwischen gesunden Lungen (Donor) und IPAH-Lungen.

Die GLP-1 Expression ist in den IPAH-Lungen (n=12) gegenüber den gesunden Donor-Lungen (n=12) signifikant reduziert. Die Mikrofotos stellen jeweils repräsentative Aufnahmen dar. Die Doppelpfeile definieren die Dicke der Gefäßwand. Die Gefäßwand der IPAH-Lunge zeigt die für die IPAH charakteristische Wandverdickung als morphologisches Korrelat des pathologischen *Remodeling*-Prozesses. Alle Daten sind als Mittelwert plus Standardfehler (SEM) angegeben. * Signifikante Unterschiede zur Donor-Kontrollgruppe.

3.3.2 Humanlungen: Donor vs. CTEPH

Die GLP-1 Expression war auch in den CTEPH-Lungen gegenüber den gesunden Donor-Lungen reduziert (**Abbildung 15**). Der Unterschied war jedoch weniger deutlich als bei dem Vergleich der Donor-Lungen mit den IPAH-Lungen. Die korrespondierenden Wertepaare für den *score value* betrugen $\sim 0,06$ (Donor) bzw. $\sim 0,03$ (CTEPH).

In der GLP-1 Immunhistochemie dominierte das Endothel der Donor-Lungen, während die CTEPH-Lungen durch eine Färbung sowohl von Endothel als auch einer diskreteren Färbung der Tunica media charakterisiert waren.

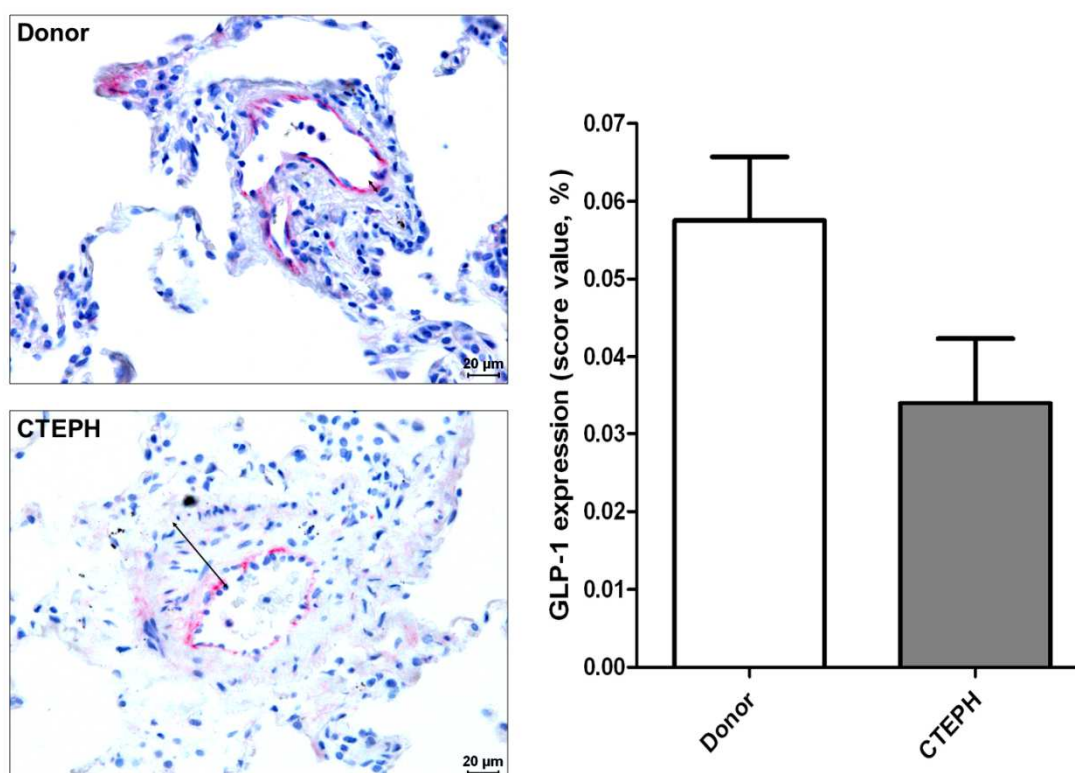


Abbildung 15: Vergleich des Expressionsprofils von GLP-1 auf pulmonalvaskulären Strukturen der humanen Lunge zwischen gesunden Lungen (Donor) und CTEPH-Lungen.

Die GLP-1 Expression ist in den CTEPH-Lungen (n=10) gegenüber den gesunden Donor-Lungen (n=12) deutlich reduziert. Die Mikrofotos stellen jeweils repräsentative Aufnahmen dar. Die Doppelpfeile definieren die Dicke der Gefäßwand. Die Gefäßwand der CTEPH-Lunge zeigt eine massive Gefäßwandverdickung infolge des vermutlich durch rezidivierende Embolien induzierten Entzündungsprozesses mit konsekutivem *Remodeling* der Gefäßwand. Alle Daten sind als Mittelwert plus Standardfehler (SEM) angegeben.

3.3.3 Rattenlungen: *Healthy control* vs. MCT

Das GLP-1 Expressionsprofil in den MCT-Rattenlungen (*score value* ~ 0,10) war gegenüber dem GLP-1 Expressionsprofil in den gesunden Kontrollen (*score value* ~ 0,24) signifikant reduziert (**Abbildung 16**). Als atypisch zu verzeichnen waren die absolut betrachtet relativ hohen Werte für die GLP-1 Expressionsprofile, welche sich in etwa auf einem Niveau mit den Werten der GLP-1R Expressionsprofile befanden, was bei den Humanlungen nicht gefunden werden konnte.

Gesunde Rattenlungen waren durch eine homogen kräftige Anfärbbarkeit von Endothel und Tunica media charakterisiert, während die MCT-Lungen im Bereich des luminalen Drittels der Tunica media schwächer positiv reagierten und eine Färbung der peripheren zwei Drittel der Tunica media gänzlich ausblieb.

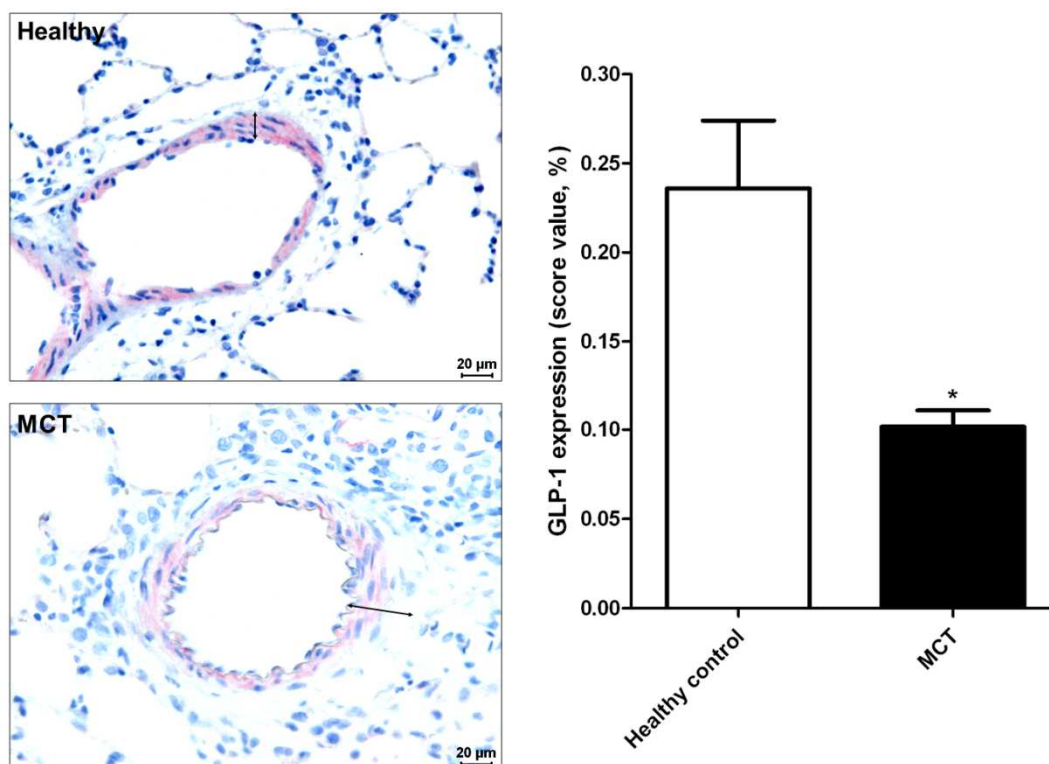


Abbildung 16: Vergleich des Expressionsprofils von GLP-1 auf pulmonalvaskulären Strukturen der Rattenlunge zwischen gesunden Lungen (*Healthy control*) und MCT-Lungen.

Die GLP-1 Expression ist in MCT-Lungen (n=12) gegenüber den gesunden Kontrollen (n=10) signifikant reduziert. Die Mikrofotos stellen jeweils repräsentative Aufnahmen dar. Die Doppelpfeile definieren die Dicke der Gefäßwand. Die Gefäßwand der MCT-Lunge zeigt die für das Modell der MCT-induzierten PH charakteristische Wandverdickung als Ergebnis des *Remodeling*-Prozesses. Alle Daten sind als Mittelwert plus Standardfehler (SEM) angegeben. * Signifikante Unterschiede zu den gesunden Kontrollen.

3.4 Zellkultur

In einem Zellkultur-Experiment sollte die anti-proliferative Potenz des GLP-1 Rezeptor Agonisten Exendin-4 auf PASMCs nachgewiesen werden. Hierzu wurden glatte Muskelzellen aus den Pulmonalarterien von Ratten mit einer MCT-induzierten PH gemäß Dahal *et al.* isoliert (231) und mit 10 % FCS in M199 als Wachstumsmedium inkubiert. In einem zweiten Schritt wurde das Wachstumsmedium durch ein Hungermedium (nur 0,1 % FCS enthalten) ersetzt; diesem war Exendin-4 in verschiedenen Konzentrationen (5 nM, 50 nM und 1 μ M) zugesetzt. Nach 24 Stunden erfolgte die Induktion der Zellproliferation mittels erneuter Inkubation in Wachstumsmedium, welches jetzt jedoch ebenfalls mit den korrespondierenden Dosen von Exendin-4 versetzt war. Die Quantifizierung der Zellproliferation erfolgte unter Verwendung von BrdU *Labeling Reagent* (5-Brom-2'-Desoxyuridin); hierzu wurde nach Zugabe eines mit Peroxidase konjugierten anti-BrdU-Antikörpers sowie eines entsprechenden Substrates die Farbe des entstehenden Reaktionsproduktes mittels Muli-Well-Spektralphotometer bei einer Absorption von $\lambda = 370$ nm gemessen.

Die Absorption der Kontrollgruppe wurde gleich 100 % gesetzt und diente somit als Referenz. Durch die Zugabe von FCS wurde die Proliferation der PASMCs induziert und die Absorption stieg auf einen Wert von ~ 174 % an. Durch eine gleichzeitige Inkubation mit Exendin-4 war dieser Effekt partiell reversibel: Exendin-4 in einer Konzentration von 5 nM ließ die Absorption unter FCS-induzierter Zellproliferation auf ~ 155 % ansteigen; eine Exendin-4 Konzentration von 50 nM senkte die Absorption hingegen auf ~ 139 %. Eine Inkubation der PASMCs mit FCS und 1 μ M Exendin-4 ergab eine Reduktion der Absorption auf ~ 126 % (**Abbildung 17**). Der anti-proliferative Effekt von Exendin-4 ist folglich direkt proportional der verabreichten Dosis, also streng dosisabhängig.

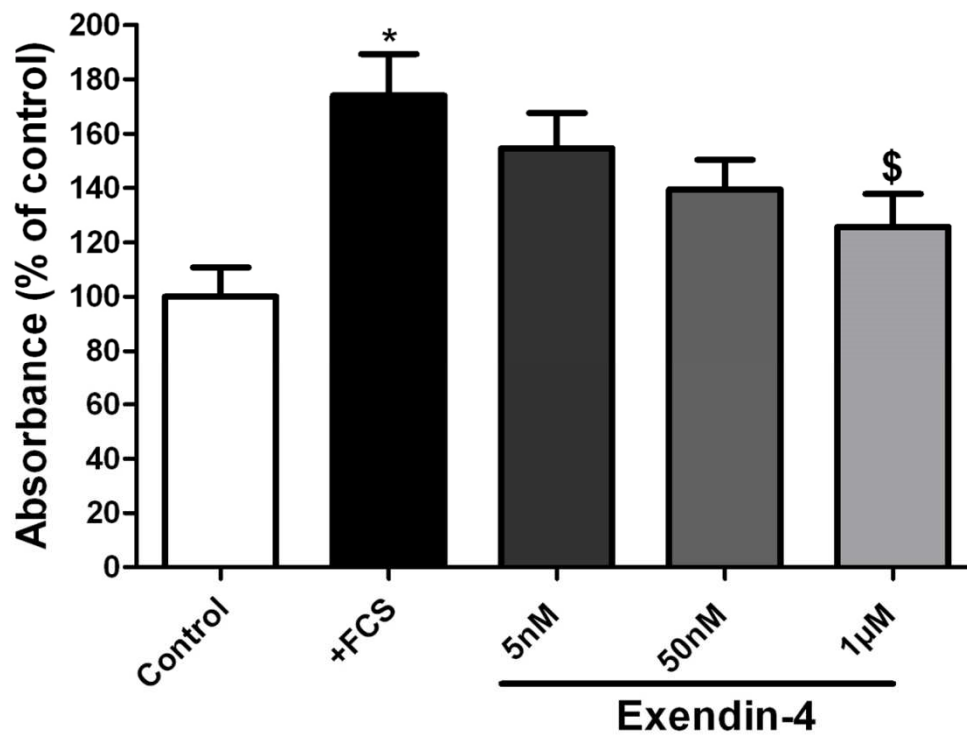


Abbildung 17: Anti-proliferativer Effekt von Exendin-4 auf die durch FCS induzierte Proliferation aus MCT-Ratten isolierter PSMCs.

Die Absorption der Kontrollgruppe (*Control*) entspricht 100 % und dient als Referenz. Durch Zugabe von FCS erfolgt eine Stimulation der Zellproliferation, folglich steigt die Absorptionsrate an. Dieser Effekt ist bei gleichzeitiger Applikation von Exendin-4 partiell reversibel. Der anti-proliferative Effekt von Exendin-4 ist dabei direkt proportional dosisabhängig. Für alle Gruppen gilt $n=8$. Die Daten sind als Mittelwert plus Standardfehler (SEM) angegeben. * Signifikante Unterschiede zur Referenzkontrolle. \$ Signifikante Unterschiede zur Gruppe der FCS-induzierten Zellproliferation.

4 DISKUSSION

4.1 Immunhistochemische Untersuchungen

4.1.1 Lokalisationsbestimmung von GLP-1R

In der vorliegenden Arbeit konnte eine Expression von GLP-1R auf pulmonal-vaskulären Strukturen nachgewiesen werden. Die genauere Lokalisationsbestimmung in Korrelation zu der immunhistochemischen Doppelfärbung von vWF und α -Actin ergab eine GLP-1R Expression sowohl auf den Endothelzellen der Intima als auch auf den glatten Muskelzellen der Media der Pulmonalarterien bzw. -arteriolen von Mensch und Ratte. Die Lokalisation des GLP-1R auf multiplen Strukturen des kardiovaskulären Systems bei Menschen und Nagetieren ist zuvor bereits vielfach beschrieben worden, sodass die Ergebnisse dieser Arbeit diesbezüglich als konsistent mit den Daten anderer Autoren angesehen werden können (232) (197). Eine Besonderheit dieser Arbeit stellt jedoch der Nachweis einer GLP-1R Expression in der für die PH charakteristisch veränderten Gefäßmorphologie dar, welche sich zudem gegenüber der physiologischen Norm als teils signifikant verändert erwiesen hat (s.u.).

4.1.2 Expressionsprofil von GLP-1 & GLP-1R

Die Resultate der vorliegenden Arbeit implizieren eine verminderte Expression von GLP-1 und GLP-1R auf pulmonalvaskulären Strukturen von an PH erkrankten Individuen gegenüber den jeweiligen gesunden Kontrollen. Diese Unterschiede in den Expressionsprofilen erwiesen sich teils als signifikant, waren tendenziell jedoch in allen untersuchten Gegenüberstellungen vorhanden. In der Pathogenese der PH wurden bereits mehrere Faktoren identifiziert, deren Verminderung eine Entstehung der Erkrankung begünstigt, so u.a. die Expression von PPAR γ (54). Ein als normwertig zu charakterisierendes Expressionsprofil von PPAR γ spielt folglich eine protektive Rolle für die Etablierung einer PH (53) und ein Mangel an PPAR γ ist mit einem erhöhten Risiko assoziiert, an PH zu erkranken (54). Inwieweit hierbei eine Analogie zu der in dieser Arbeit festgestellten verminderten Expression von GLP-1/GLP-1R besteht, muss hingegen in weiterführenden Experimenten untersucht werden. Es bleibt jedoch eine Implikation für eine mögliche (Substitutions-)Therapie der PH mittels GLP-1R Agonisten.

4.1.3 *Scoring analysis*

Die Bestimmung des Expressionsprofils von GLP-1 und GLP-1R auf pulmonal-vaskulären Strukturen wurde in der vorliegenden Arbeit mittels *scoring analysis* durchgeführt. Die *scoring analysis* wiederum stellt ein manuelles und relativ aufwändiges Verfahren zur Quantifizierung immunhistochemischer Färbeergebnisse dar (233). Letztlich ist sie, insbesondere bei schwachen Farbtönen bedingt durch nur geringe Expressionsintensitäten, bisweilen auf das subjektive Farbempfinden des Untersuchers angewiesen. Hierbei spielt auch die Spezifität der verwendeten Antikörper eine Rolle. Die Differenzierung von Artefakt und tatsächlich positiv reagierendem Gewebe stellt eine weitere Schwierigkeit bei der Anwendung dieser Methode dar. Ebenso bestand die Möglichkeit, dass gewisse Areale eines Präparates oder gar ganze Präparate nicht von der Färbung erfasst worden waren. Wo sich dieser Verdacht aufdrängte, wurde eine Nachfärbung eines weiteren Schnittes der gleichen Lunge durchgeführt und mit dem Originalpräparat verglichen. Auch gilt es, zu bedenken, dass das untersuchte Präparat - insbesondere im Fall der humanen Lungen - jeweils nur einen kleinen Ausschnitt der entsprechenden Lunge repräsentiert. Diese Tatsache verdeutlicht sich in den bisweilen relativ stark ausgeprägten intra- und interindividuellen Differenzen der Expressionsintensitäten. Diese schienen zudem partiell auch von der Lage des Gefäßes im Präparat abhängig zu sein: Unterschieden werden konnte zwischen zentral oder peripher (subpleural) gelegenen Gefäßen, solchen in unmittelbarer Bronchusnähe (arterielles System) oder in Bindegewebssepten verlaufend (venöses System) sowie Gefäßen in lokal entzündlichem Milieu (Ansammlungen von Leukocyten). Gerade für die CTEPH-Lungen waren lokal sehr unterschiedliche Färbeintensitäten im gleichen Präparat ein wiederholt anzutreffendes Charakteristikum; ein Umstand, welcher u.a. dem Pathomechanismus der CTEPH geschuldet sein könnte und seine Begründung in der Gegenüberstellung von thromboembolisch verschlossenen Arealen und solchen, in denen dies nicht der Fall ist, findet. Bedingt durch die Tatsache, dass die erkrankten Lungen aufgrund des pulmonalvaskulären *Remodelings* deutlich verbreiterte Gefäßwände aufwiesen, war demzufolge natürlich auch die potenziell anzufärbende Fläche *a priori* vergrößert. Nicht zu Letzt sei noch auf die Interferenz mit anderen positiv reagierenden Strukturen, welche jedoch nicht dem pulmonalvaskulären Gewebe zugerechnet werden können, hingewiesen, wie bspw. Alveolarmakrophagen, der Surfactantfilm des Bronchialepithels und Zellen der Bronchialmuskulatur.

Nichtsdestotrotz bzw. gerade aufgrund der Kenntnis dieser o.g. Problematiken ist die *scoring analysis* in der vorliegenden Arbeit unter permanenter bestmöglicher Ausschaltung aller beschriebenen Störfaktoren durchgeführt worden, sodass die gewonnenen Ergebnisse durchaus als repräsentativ zu werten sind.

4.2 Zellkultur

In der vorliegenden Arbeit wurde ein anti-proliferativer Effekt des GLP-1R Agonisten Exendin-4 auf die FCS-induzierte Proliferation von PASMCs nachgewiesen. Dieses Resultat deckt sich mit den Ergebnissen anderer Autoren: Hirata *et al.* fanden ähnliche Tendenzen bei der PDGF-induzierten Proliferation von glatten Muskelzellen, welche zuvor aus Rattenarterien isoliert worden waren (215). Der zugrunde liegende Signalweg wurde als cAMP/PKA-abhängig beschrieben (215). Goto *et al.* lieferten in diesem Punkt allerdings widersprüchliche Resultate (230). Diese Diskrepanz wird von den Autoren selbst auf die Unterschiedlichkeit der jeweils verwendeten Studien-*Designs* zurückgeführt (215). Da die vorliegende Arbeit jedoch im Hinblick auf eine therapeutische Option von Exendin-4 in der Behandlung der PH angefertigt wurde, war es essentiell, nachzuweisen, dass der anti-proliferative Effekt von Exendin-4 auf die Proliferation von PASMCs übertragbar ist. Die Tatsache, dass die für diese Arbeit verwendeten PASMCs aus MCT-Ratten isoliert wurden, unterstreicht die explizite Nähe des hier verwendeten Modells zur IPAH, wenngleich Hirata *et al.* bedingt durch die Wahl von PDGF als Proliferationsstimulus zumindest in diesem Punkt größere Nähe zur Pathogenese der PH bewiesen (215) (234).

4.3 Implikationen für eine Therapie der PH mit GLP-1 Analoga

Die Pathogenese der PH ist im Wesentlichen durch eine Kombination aus proliferativen und inflammatorischen Prozessen gekennzeichnet (37). Daraus ergibt sich ein pulmonalvaskuläres *Remodeling* in vasokonstriktiv geprägtem Mediatorenmilieu (37). Die dadurch bedingte Gefäßobstruktion führt zu einer Nachlasterhöhung des rechten Ventrikels, welche zunächst in einer Rechtsherzbelastung mit kompensatorisch einsetzender Hypertrophie des rechtsventrikulären Myokards mündet (235). Wird jedoch ein kritischer Punkt überschritten, kommt es infolge rechtsventrikulärer Dilatation zur Dekompensation der Rechtsherzinsuffizienz mit Progression in Rechtsherzversagen, welches letztlich zum Tode führt (235).

Sowohl die vorliegende Arbeit als auch die Ergebnisse vielfältiger tierexperimenteller, präklinischer sowie klinischer Studien nähren die Hoffnung, dass GLP-1 Analoga auf verschiedensten Ebenen positiv in diesen Pathogeneseprozess intervenieren könnten:

Summer *et al.* führen ebenso wie Bogaard *et al.* an, dass Übergewicht eine Rolle in der Pathogenese der PH spielen könnte (236) (237). GLP-1 Analoga haben im Rahmen der T2DM-Therapie durch eine verzögerte Magenentleerung sowie hypothalamisch vermittelte Appetitminderung zu signifikanter Gewichtsreduktion geführt (137).

Zustände chronischer Hyperglykämie bedingen eine verminderte eNOS-Aktivität bei zugleich erhöhten ET-1 Konzentrationen, erhöhte Spiegel von VEGF begleitet von abnormer Angiogenese sowie eine gestörte Gefäßpermeabilität und Okklusion von Kapillaren und größeren Gefäßen durch vermehrte Expression von TGF- β und PAI-1 (160). Die EZM hingegen erfährt einen Umbau in Form gesteigerter Synthese von Kollagenen und Fibronektin (160). Gleichzeitig kommt es zu einer verstärkten Expression pro-inflammatorischer Zytokine und NF- κ B vermittelt zu einer Aktivierung und Transkription pro-inflammatorischer Gene (160). Schließlich resultiert aus einer vermehrten Akkumulation von ROS ein gesteigertes Maß an oxidativem Stress, welcher sich seinerseits wiederum in einer endothelialen Dysfunktion manifestiert (160). All diese Faktoren - mit Ausnahme von VEGF, dessen Rolle in der Pathogenese der PH kontrovers diskutiert wird (44) - sind dem derzeitigen Stand der Forschung zufolge maßgeblich für die Etablierung einer PH verantwortlich (37). Somit besteht zumindest theoretisch allein durch eine Reduktion der chronischen Hyperglykämie durch GLP-1 Analoga, also deren Haupteffekt, eine positive Intervention in den Pathogeneseprozess der PH auf mannigfaltigen Ebenen.

Hirata *et al.* wiesen zusätzlich eindrucksvoll einen anti-proliferativen Effekt von GLP-1R Agonisten auf zweierlei Wegen - sowohl *in vivo* als auch *in vitro* - nach (215). In ihrer Arbeit reduzierte Exendin-4 signifikant die Ausbildung einer Neointima nach artifiziell gesetzter Gefäßläsion bei Mäusen (215). Dieser anti-proliferative Effekt bestätigte sich in einem Zellkultur-Experiment mit PDGF-induzierter Proliferation von aus Rattenaorten isolierten glatten Muskelzellen (215). Hierfür wurde ferner ein cAMP/PKA abhängiger Signalweg verantwortlich gemacht (215). Auch in der vorliegenden Arbeit wurde ein antiproliferativer Effekt von Exendin-4, allerdings auf die FCS-induzierte Proliferation von PSMCs, nachgewiesen.

Besagte Formation einer Neointima in den Femoralarterien der Mäuse nach Gefäßläsion korreliert pathogenetisch gesehen in hohem Maß mit dem pulmonalvaskulären *Remodeling* in Form einer Neomuskularisierung in der Etablierung einer PH. Die Neomuskularisierung ist durch Migration glatter Muskelzellen und/oder Rekrutierung von Fibroblasten und deren Differenzierung in glatte Muskelzellen charakterisiert (67). Hinzu addieren sich Hypertrophie sowie Hyperplasie der ortsständigen Zelltypen (65) (82).

Der exakte Ablauf der Neomuskularisierung ist noch nicht abschließend geklärt; auch eine Beteiligung von Endothelzellen wird derzeit diskutiert (238). Nichtsdestotrotz nähern die Effekte von Exendin-4 auf die Ausbildung einer Neointima im Mausmodell die Hoffnung der Existenz einer Entsprechung in der Pathogenese der PH. Bezüglich der Formation einer Neointima und anti-proliferativem Effekt von Exendin-4 *in vitro* existieren konsistente Daten von Goto *et al.* (230); Terawaki *et al.* hingegen zeigten ähnliche Tendenzen in einem Experiment mit dem DPP-IV-Inhibitor Linagliptin (216).

Hirata *et al.* konnten zusätzlich zu einem anti-proliferativen Effekt auch einen anti-inflammatorischen Effekt von Exendin-4 nachweisen (215). Exendin-4 reduzierte signifikant die Expression von TNF- α in Peritonealmakrophagen nach Exposition gegenüber einem inflammatorischen Stimulus in Form von LPS (215).

Da sowohl unkontrollierte Zellproliferation insbesondere von glatten Muskelzellen sowie inflammatorische Prozesse jeweils zentrale Aspekte in der Pathogenese der PH repräsentieren (37), kann vermutlich von einem Benefit von GLP-1R Agonisten in der Behandlung der PH ausgegangen werden; dieser Behandlungsansatz dürfte zudem strukturell geprägt sein. Mita und Watada wiesen ebenfalls anti-proliferative, anti-inflammatorische sowie vasodilatorische Effekte nach (239).

Im weitesten Sinne bestehen zwischen der Pathogenese der PH und jener der Arteriosklerose gewisse Gemeinsamkeiten. Prinzipiell liegt beiden Erkrankungen ein *Remodeling* der Gefäßwand zugrunde. GLP-1 Analoga haben bezüglich der Entstehung respektive Progression arteriosklerotischer Plaques positive Effekte bewiesen (239): Durch Verminderung einer Entzündungsreaktion in Monocyten/Makrophagen sowie Endothelzellen mit gesteigerter Synthese von NO bei gleichzeitig verminderter Akkumulation von ROS und Hemmung der Proliferation glatter Muskelzellen kommt es zu einer verringerten Leukozytenadhäsion mit konsekutiver Größenreduktion arteriosklerotischer Plaques (210) (239) (240). Hierbei spielt auch die Suppression einer Aktivierung von NF- κ B durch GLP-1R Agonisten eine Rolle (210). NF- κ B gilt als Schlüsselregulator in der Transkription pro-inflammatorischer Moleküle wie TNF- α und MCP-1 (210).

Zudem kommt es durch eine Inhibierung der Phosphorylierung von NF- κ B durch Liraglutid zur einer verminderten Expression von ET-1 (213), einem potenten Vaso-konstriktor und ebenfalls Schlüsselmolekül in der Pathogenese der PH (214), wie die durchaus erfolgreiche Behandlung der PH mittels ET-Rezeptorantagonisten demonstriert (241).

NO wird in der Wahrung der endothelialen Integrität und somit des Erhalts eines physiologischen Milieus im Gefäßbett eine zentrale Bedeutung zuteil (242). Bisher etablierte Therapien der PH sowohl durch Inhibierung des cGMP-degradierenden Enzyms Phosphodiesterase-5 mittels PDE5-Inhibitoren (243) als auch neuerdings die NO-unabhängige Stimulation der cGMP bildenden sGC durch Riociguat (244) belegen die essentielle Rolle einer verminderten NO-Bildung in der Pathogenese der PH (245). GLP-1 wirkt GLP-1R vermittelt im Sinne einer Aktivitätssteigerung der eNOS mit konsekutiv erhöhten NO-Spiegeln (182). Dieser stimulierende Effekt auf die eNOS ist insbesondere in Experimenten mit HUVECs nachgewiesen worden und es wurde zusätzlich gefunden, dass die Erhöhung der eNOS-Aktivität nicht nur GLP-1R abhängig (direkt durch GLP-1(7-36)NH₂), sondern auch GLP-1R unabhängig (indirekt durch GLP-1(9-36)NH₂) zustande kommt (182). Durch NO wiederum erfolgt eine Aktivierung der sGC, was in einer Erhöhung des *second messengers* cGMP resultiert (110). cGMP führt primär zu einer Vasodilatation durch Relaxation glatter Muskelzellen in der Media der Gefäßwände (110). Sekundär sind jedoch weitere cGMP-vermittelte Mechanismen bekannt, welche ihrerseits ebenfalls einen Benefit in der Behandlung der PH versprechen, wie Hemmung der Thrombozytenaggregation, der Leukozytenadhäsion sowie der Migration und Proliferation glatter Muskelzellen (246).

Nur am Rande sei erwähnt, dass GLP-1 aufgrund seiner ausgeprägten anti-proliferativen Potenz und der Tatsache, dass einige Tumoren (insbesondere neuronaler, endokriner oder embryonaler Differenzierung) eine hohe GLP-1R Expression aufweisen, kürzlich auch zum Gegenstand der onkologischen Forschung avanciert ist (247).

Der Tod von an PH erkrankten Patienten ist zumeist keine Erscheinung der primär pulmonalen Pathologie, sondern vielmehr der sich daraus ergebenden kardialen Problematik einer dekompensierten Rechtsherzinsuffizienz infolge Nachlastserhöhung des rechten Ventrikels (248). Während die molekularen Mechanismen, welche initial zur kompensatorischen Hypertrophie des rechtsventrikulären Myokards führen, recht gut erforscht sind, sind die Faktoren, die zu einem Wechsel vom kompensierten Stadium der Rechtsherzinsuffizienz in das dekompensierte Stadium führen, weitgehend

unerforscht (37). In Versuchen wurde gezeigt, dass eine solche Dekompensation bzw. überhaupt erst die Entwicklung einer Insuffizienz vermutlich nicht allein aufgrund der progredient erhöhten Nachlast des rechten Ventrikels zustande kommt, sondern durch zusätzliche Faktoren in die Wege geleitet wird (37). Eine Exazerbation inflammatorischer Prozesse sowie eine Akkumulation von ROS und RNS (*reactive nitrogen species*, reaktive Stickstoffspezies) werden zurzeit als solche Faktoren diskutiert (249). Tierexperimentell werden außerdem aus dem pathologisch veränderten pulmonalen Gefäßbett sezernierte Faktoren, welchen diesen Übergang ebenfalls begünstigen sollen, vermutet (250). GLP-1 bzw. dessen Analogon Liraglutid führt nicht nur zu einer Verminderung dieser möglicherweise involvierten Faktoren durch seine anti-inflammatorische Potenz sowie eine Verringerung der Anreicherung von ROS (212), sondern hat auch direkt kardioprotektive Effekte bewiesen (197). Diese äußern sich in einer Verbesserung der myokardialen Kontraktilität vermutlich infolge erhöhter myokardialer Glucoseaufnahme insbesondere unter ischämischen Bedingungen (sog. *metabolic shift* des Myokards) (197). Auch konnte ein Benefit von GLP-1 in experimentellen Modellen der dilatativen Kardiomyopathie gezeigt werden (159). Eine GLP-1R vermittelte zytoprotektive Wirkung auf Kardiomyozyten durch Aktivierung der antiapoptotisch wirksamen PI3-K und von MAP-K hat sich zudem ebenso tierexperimentell bestätigt (199) wie eine Aktivierung von gleichfalls antiapoptotisch wirkender PKB (Akt) und GSK-3 β bei gleichzeitiger Inaktivierung von MMP-9 (251). Des Weiteren wurde bei Patienten mit einer Herzinsuffizienz in den Stadien NYHA II-IV eine Verbesserung der Lebensqualität sowie eine Erhöhung der LVEF unter GLP-1 Applikation nachgewiesen (252). Inwiefern diese primär linksventrikulär erhobenen Resultate auf den rechten Ventrikel übertragbar sind, gilt es in weiteren Studien zu überprüfen. Dennoch suggerieren diese Ergebnisse verbesserter kardialer Parameter einen möglichen Vorteil von GLP-1 Analoga bei der Herauszögerung der Etablierung einer Rechtsherzinsuffizienz bzw. Verhinderung von deren Dekompensation.

Bei der Evaluation einer potenziellen Therapie der PH mittels GLP-1R Agonisten gilt es jedoch, einige Besonderheiten zu beachten (181):

Die Gruppe der GLP-1 Analoga stellt pharmakokinetisch und pharmakodynamisch betrachtet eine recht heterogene Gruppe dar; deutlich wird dies bspw. in den Differenzen zwischen der anti-hyperglykämischen Wirkung der einzelnen Wirkstoffe in der Therapie des T2DM, welche sich zudem stark abhängig von der jeweils

verwendeten Applikationsform zeigte (181). Da Exenatid und Liraglutid die therapeutisch am häufigsten angewandten und folglich am besten evaluierten Substanzen dieser Wirkstoffgruppe darstellen (177), ist über Pharmakokinetik sowie Pharmakodynamik der anderen GLP-1 Analoga relativ wenig bekannt, erst recht im Zusammenhang mit deren Wirkung auf das kardiovaskuläre Risikoprofil. Weil diese Arbeit sich ausschließlich auf Exenatid (bzw. dessen natürlich vorkommendes Vorbild Exendin-4) fokussiert hat, gilt es, die Wirkung der anderen Substanzen ebenso in weiterführenden Experimenten zu prüfen.

Auch nicht außer Acht gelassen werden darf die Gruppe der DPP-IV-Inhibitoren (179). Theoretisch sollten deren Effekte bezüglich Hyperglykämiekontrolle und Verminderung kardiovaskulärer Risikofaktoren sowie daraus abgeleitete therapeutische Implikationen für die PH mit denen von GLP-1 Analoga identisch sein. Diverse Studien haben jedoch gezeigt, dass trotz des augenscheinlich gleichen Wirkmechanismus signifikante Differenzen zwischen den Effekten von GLP-1 Analoga und DPP-IV-Inhibitoren bestehen (253). Zurückgeführt wird dies zum einen auf Interferenzen mit dem *proposed dual pathway* der GLP-1-Wirkung (254): DPP-IV-Inhibitoren greifen stärker in das fragile Gleichgewicht zwischen GLP-1(7-36)NH₂ und GLP-1(9-36)NH₂ ein, als dies bei den synthetischen DPP-IV resistenten GLP-1 Analoga, welche ihre Wirkung nahezu ausschließlich durch Bindung an den GLP-1R entfalten, der Fall ist (254). A. Sjöholm führt diese Diskrepanz zusätzlich auf eine gewisse Dosisabhängigkeit zurück (160): Während durch die Applikation von exogenem GLP-1 in relativ kurzer Zeit supra-physiologische Konzentrationen erreicht werden können, führt die Applikation von DPP-IV-Inhibitoren zumeist nicht zu einem Konzentrationsanstieg des in der aktiven Hauptisoform vorliegenden GLP-1 über den physiologischen Bereich hinaus (160).

Die Entschlüsselung der Wirkweise des indirekten, GLP-1R unabhängigen, Wirkmechanismus des GLP-1(9-36)NH₂ sowie die Zuordnung der biologischen Wirkungen von GLP-1 zu jeweils einem der beiden Wege wird zusätzlich zu einem vertieften Verständnis der überaus komplexen Biologie der Inkretine beitragen, welches für einen adäquaten Umgang mit diesen Substanzen zweifelsohne unumgänglich ist (140) (182).

Als nicht unerheblicher Vorteil zu werten ist die Tatsache, dass sowohl GLP-1 Analoga als auch DPP-IV-Inhibitoren auf eine langjährige Anwendung in der Therapie des T2DM zurückblicken können; ein Umstand, der Gefahren bezüglich der Arzneimittelsicherheit recht zuverlässig minimiert, auch wenn sich diesbezüglich neuerdings vermehrt Bedenken häufen (255).

4.4 Fazit & klinische Perspektive

Die in der vorliegenden Arbeit gefundenen Ergebnisse (Expression von GLP-1R auf pulmonalvaskulären Strukturen, teils signifikante Verminderung der GLP-1R sowie der GLP-1 Expression in an PH erkrankten Individuen und der anti-proliferative Effekt von Exendin-4 auf PSMCs) implizieren einen möglichen Erfolg einer Therapie der PH mit GLP-1 Analoga wie bspw. Exendin-4/Exenatid.

Hierbei muss sich die weitere Forschung jedoch im Klaren sein, dass der immensen Komplexität der Pathogenese der PH inklusive der mannigfaltigen wechselseitigen Beziehungen ihrer einzelnen Faktoren untereinander ein ebenso komplexes und wechselseitiges Geflecht der Biologie der Inkretine und ihres Einsatzes in der Pharmakotherapie gegenübersteht. Aber genau hierin könnte ein wesentlicher Vorteil liegen. Daher gilt es zukünftig, die Äquipotenz verschiedener GLP-1 Analoga untereinander sowie im Vergleich mit DPP-IV-Inhibitoren in weiterführenden Experimenten zu untersuchen.

Denn, selbst wenn sich eine Therapie der PH mittels des GLP-1R Agonisten Exenatid etablieren sollte, so gilt nach wie vor als oberstes wissenschaftliches Prinzip:

„Wir müssen unbedingt Raum für Zweifel lassen,
sonst gibt es keinen Fortschritt, kein Dazulernen.
Man kann nichts Neues herausfinden,
wenn man nicht vorher eine Frage stellt.
Und um zu fragen, bedarf es des Zweifelns.“

Richard P. Feynman[†]

[†] Richard Phillips Feynman, geboren am 11. Mai 1918 in Queens, New York; gestorben am 15. Februar 1988 in Los Angeles war ein amerikanischer Physiker und Nobelpreisträger des Jahres 1965.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die PH als schwerwiegende Erkrankung des Lungengefäßsystems mit einer schlechten Prognose ist durch einen erhöhten pulmonalarteriellen Widerstand infolge pathologischer *Remodeling*-Prozesse definiert. Die daraus resultierende Rechtsherzbelastung führt bei Dekompensation in Rechtsherzversagen letztlich zum Tod. Besagten *Remodeling*-Prozessen liegen dem aktuellen Forschungsstand zufolge in erster Linie sowohl pro-inflammatorische als auch pro-proliferative Stimuli zugrunde, wenngleich die Pathogenese der PH noch nicht vollständig geklärt ist.

Das körpereigene Inkretinhormon GLP-1 bzw. dessen Analogon Exendin-4 zeigte in diversen Experimenten sowohl anti-inflammatorische als auch anti-proliferative Potenz, was es als Therapieoption in der Behandlung der PH attraktiv macht. Die bisher etablierten Therapiekonzepte der PH umfassen lediglich eine Symptomkontrolle der Erkrankung in Form einer pharmakotherapeutisch vermittelten Vasodilatation. Eine potenzielle Therapie der PH mit dem GLP-1R Agonist Exendin-4 hingegen verfolgt einen kausalen Therapieansatz durch Intervention in die zugrundeliegende Pathophysiologie der Erkrankung in Form einer Inhibierung unkontrollierter Proliferation und Inflammation.

In der vorliegenden Arbeit konnte durch Methoden der Immunhistochemie gezeigt werden, dass GLP-1 und sein Rezeptor GLP-1R in Gefäßen sowohl gesunder Lungen als auch in Lungengefäßen von an IPAH bzw. CTEPH erkrankten Patienten exprimiert werden. Zudem konnte mittels *scoring analysis* nachgewiesen werden, dass die Expression von GLP-1 und GLP-1R in den erkrankten Lungen teils signifikant reduziert ist. Eine Gegenüberstellung im MCT-Rattenmodell der PH lieferte tendenziell identische Resultate. In einem Zellkultur-Experiment wurde abschließend der anti-proliferative Effekt von Exendin-4 auf die FCS-induzierte Proliferation von PSMCs nachgewiesen. Der anti-proliferative Effekt erwies sich zudem als tendenziell dosisabhängig. Die Zusammenschau dieser Ergebnisse impliziert einen möglichen Erfolg einer (Substitutions-)Therapie mit GLP-1 in Form einer Applikation von Exendin-4 bei PH.

6 SUMMARY

PH is a severe pulmonary vascular disease of poor prognosis and it is characterized by a significantly elevated pulmonary arterial pressure as a result of pathological remodeling processes. Resulting increased afterload of the right heart can lead to death by decompensation into right heart failure. According to the current state of research, pro-proliferative stimuli as well as pro-inflammatory stimuli are mainly involved in pulmonary vascular remodeling, although pathogenesis of PH is not yet fully understood.

The endogenous incretin hormone GLP-1, respectively its analogue Exendin-4, showed anti-inflammatory and anti-proliferative power in various experiments, causing it to be an attractive option in the treatment of PH. The so far established concepts of PH therapy contain merely a control of PH symptoms in the form of vasodilation through corresponding pharmacological therapy. A potential therapy of PH with the GLP-1R agonist Exendin-4 however tracks a causal therapy approach through intervention in the underlying pathophysiology of PH by inhibition of uncontrolled proliferation and inflammation.

In the present study methods of immunohistochemistry revealed that GLP-1 and its receptor GLP-1R are expressed on pulmonary vasculature of healthy lungs as well as on pulmonary vasculature of IPAH- and CTEPH-lungs. Furthermore, scoring analysis indicated partly significant reductions of GLP-1 and GLP-1R expression in lungs of patients suffering from PH. In addition, MCT rat model of PH delivered tendentially identical results. Finally, the anti-proliferative effect of Exendin-4 on the FCS-induced proliferation of PASMCs was proved in a cell culture experiment. The anti-proliferative effect was shown to be potentially dose-dependent. Taking all these results together, a potential benefit of a (substitution-)therapy of PH with GLP-1 in the form of Exendin-4 can be implied.

7 ANHANG

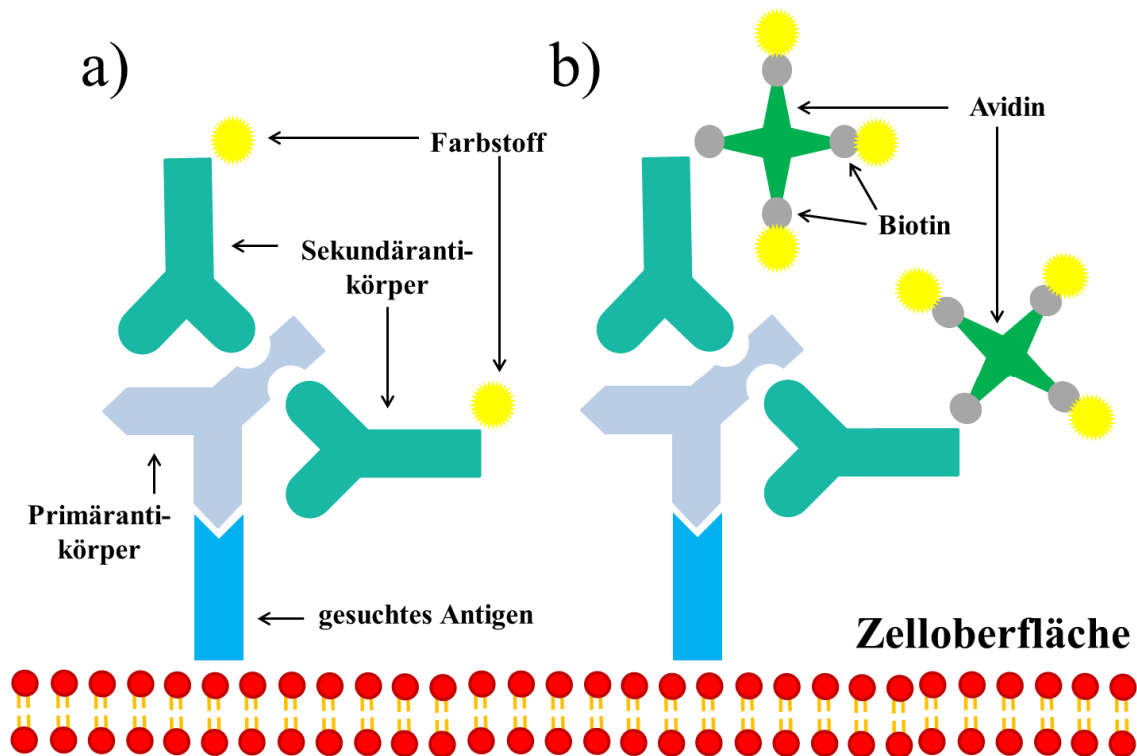
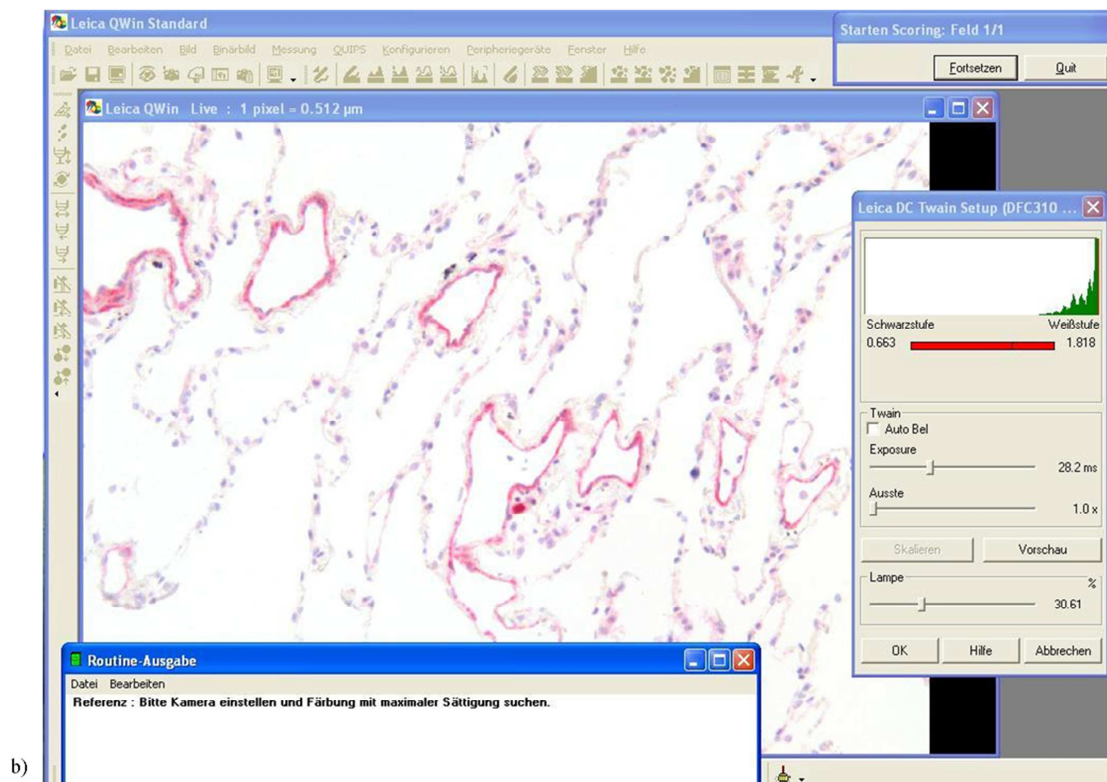
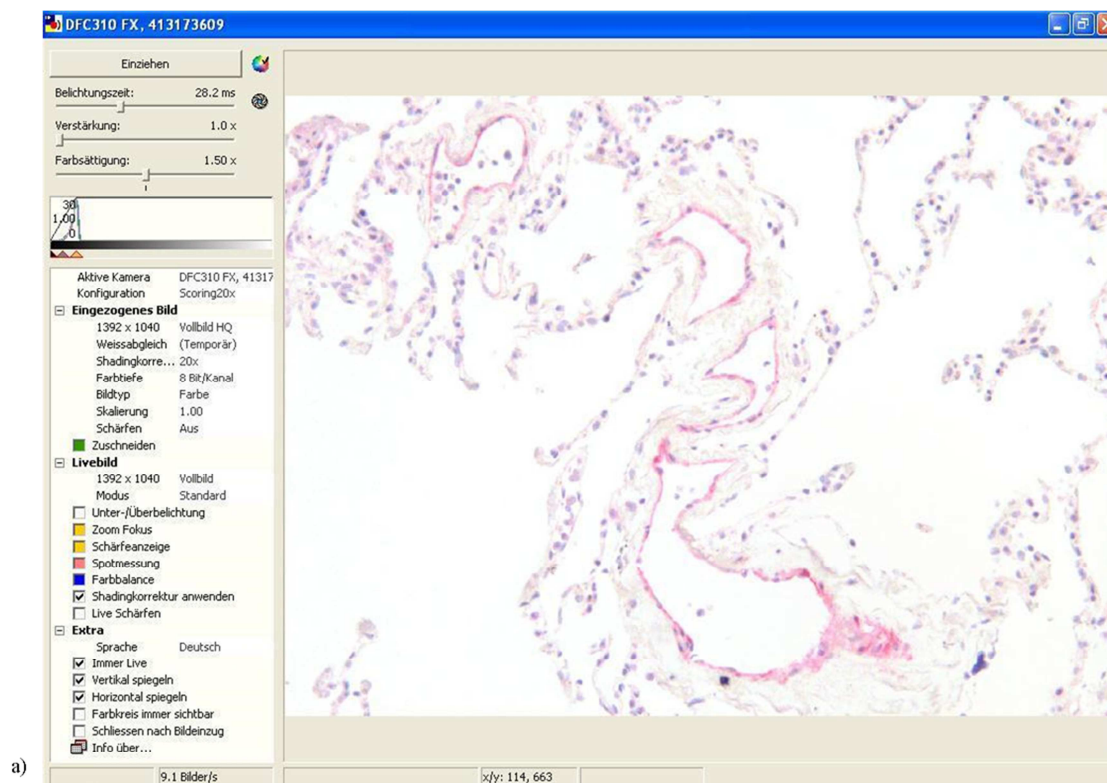
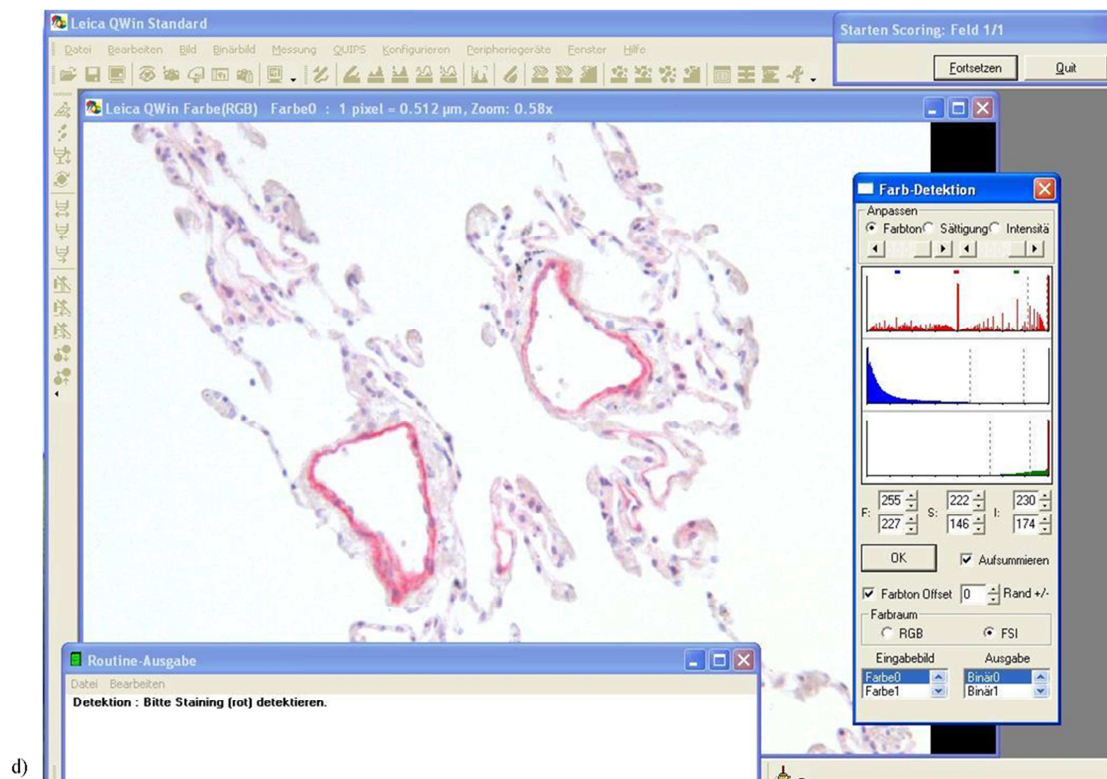
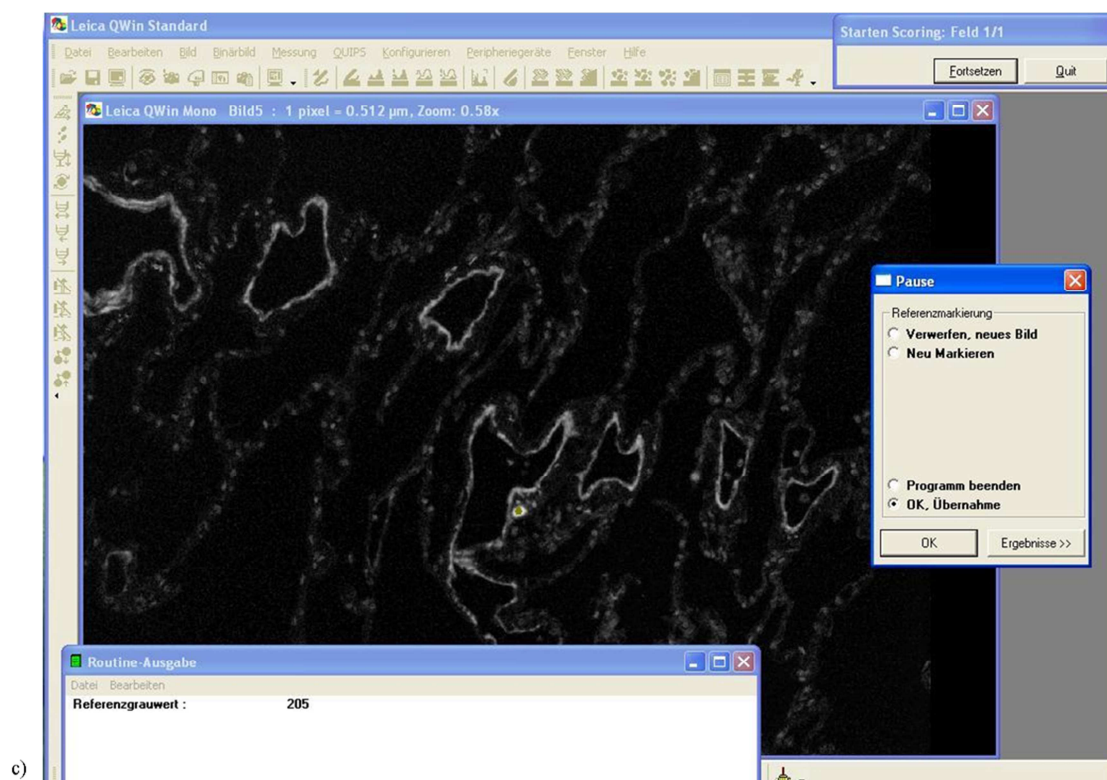


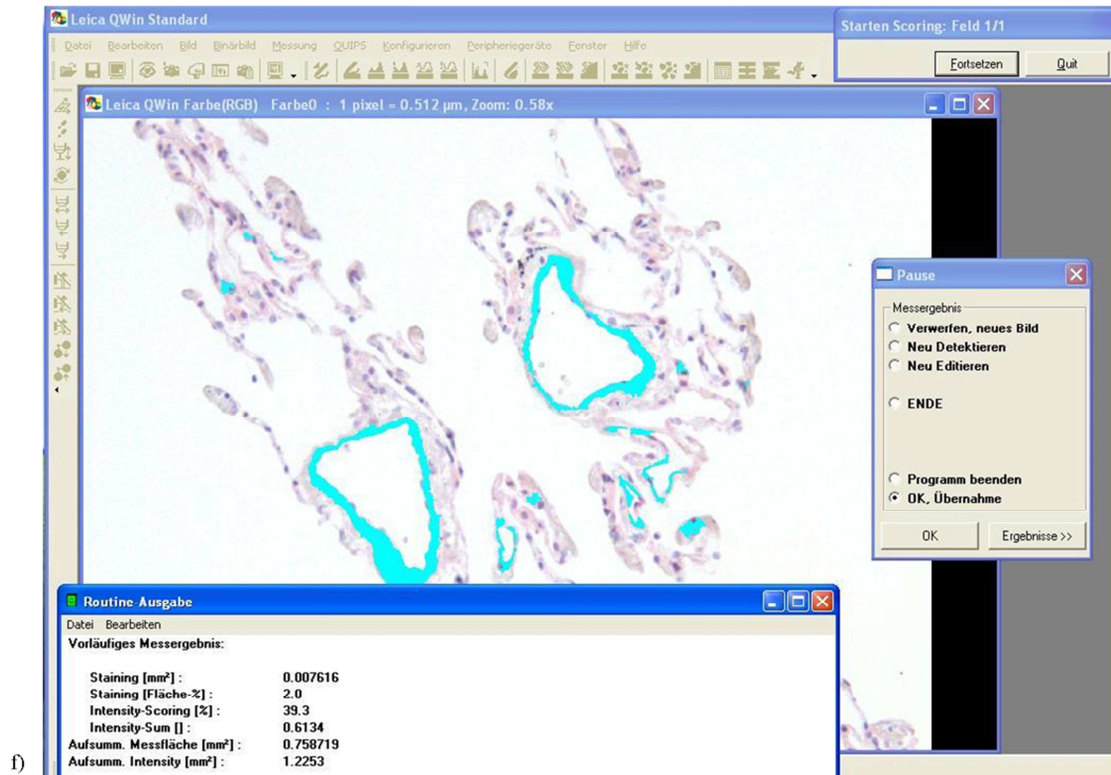
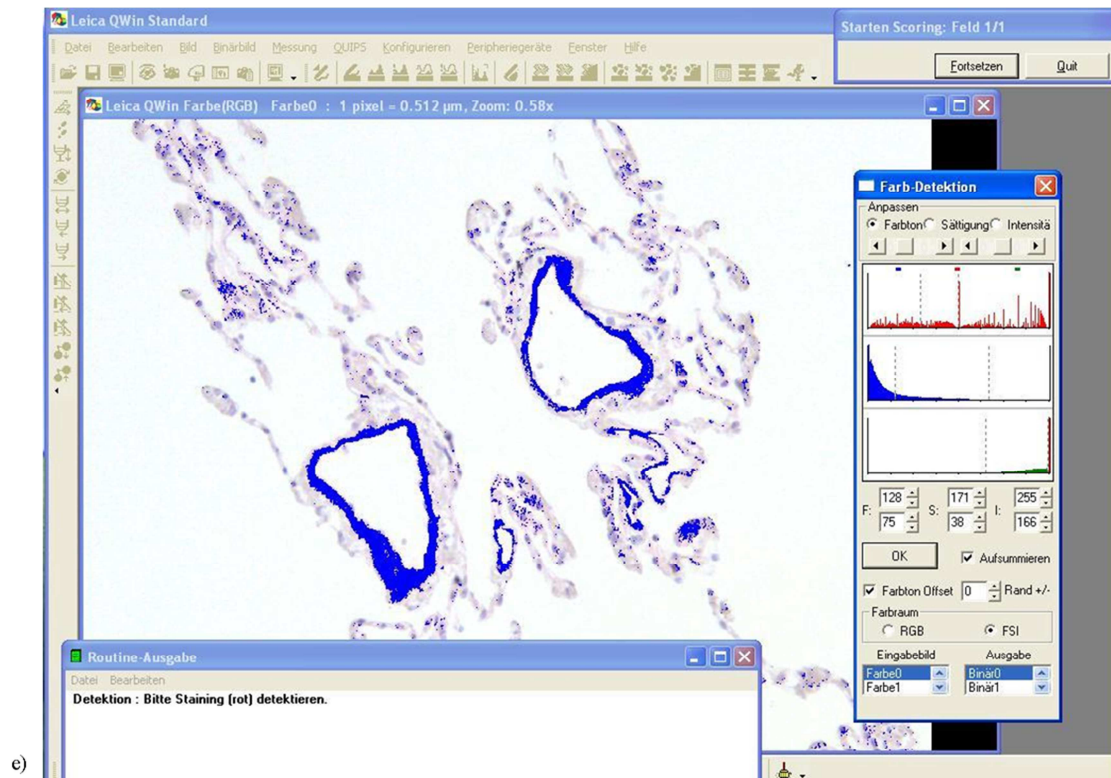
Abbildung 18: Schematische Darstellung der immunhistochemischen Reaktion.

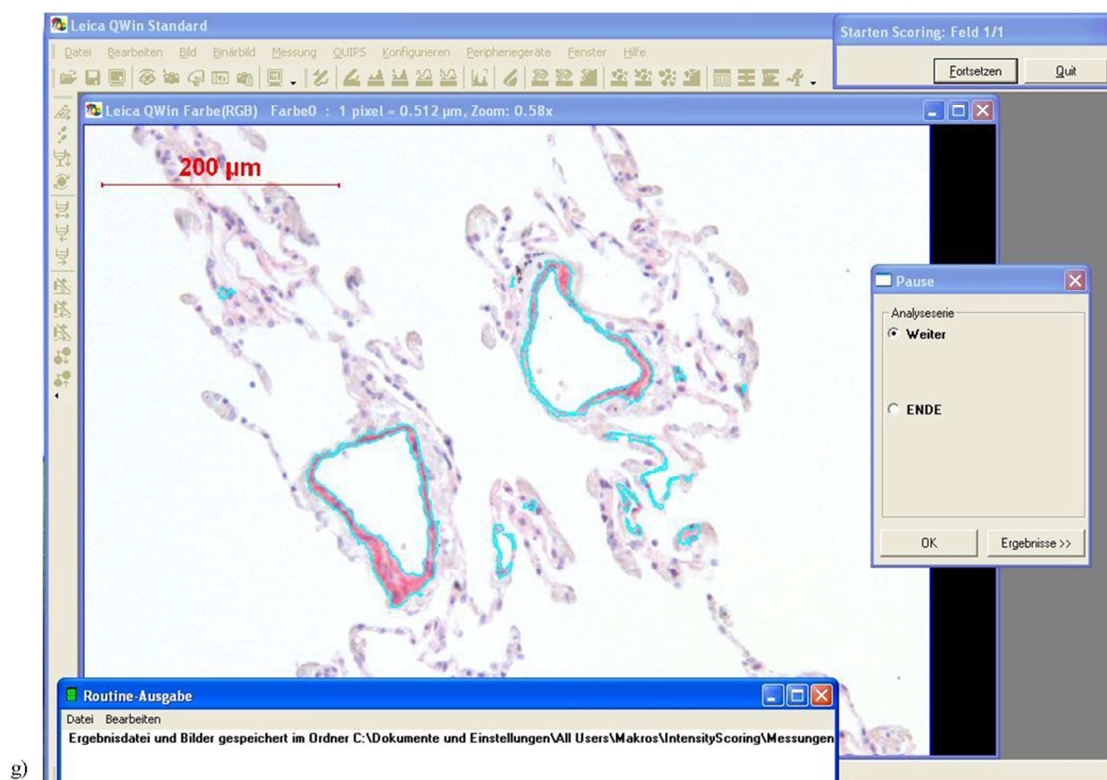
- a) Ablauf der indirekten Reaktion:** Im ersten Schritt reagiert der Primärantikörper (hellblau) mit dem gesuchten Antigen (blau). Anschließend bindet der Sekundärantikörper (türkis) an den gebundenen Primärantikörper. An den Sekundärantikörper sind Enzymmoleküle gekoppelt (meist Peroxidase oder alkalische Phosphatase). Diese wandeln in einem letzten Reaktionsschritt geeignete Substrate in einen unlöslichen Farbstoff (hier: gelb) um. Dies entspricht dem letztendlich sichtbaren Farbsignal.
- b) Verstärkung durch den Avidin-Biotin-Komplex:** Komplexe aus Avidin (grün) und Biotin (grau) können an den Sekundärantikörper (türkis) binden. An dieser Bindung nicht beteiligte Biotinmoleküle stehen für die Bindung von sehr viel mehr Enzymmolekülen zur Verfügung. Im letzten Reaktionsschritt entsteht somit sehr viel mehr Reaktionsprodukt (hier: gelb) als ohne Verwendung des Avidin-Biotin-Komplexes.

Selbsterstelltes Schema basierend auf Roessner *et al.* (256).









h)

Scoring, single phase					
1	Leica QWin	Date:			
2		Time:			
3		User:			
4		Meas-Nr:			
5					
6			Meas. images field sum (mm²):	162.5776	
7			Images:	448	
8	Reference:	Intensity Mean [0...255]			
9		205			
10		Scoring [0...255]	Scoring %	Score Value %	Area %
11	Intensity Mean	56.4	35.91	0.50	1.39
12	Sum	25260.82786	2.25194	132.949	
13	Mean	56.39	0.00503	0.297	
14	Single results				
15	Image	Intensity Mean [0...255]	Area [µm²]	Intensity Sum (Area mm² * IntensityMean)	Intensity %
16	1	55.400	2199.61840800	0.122	35.361
17	2	63.508	342.23272700	0.022	40.537
18	3	51.633	1283.50378400	0.066	32.957
19	4	55.807	189.19757100	0.011	35.622
20	5	55.721	5002.20556800	0.329	41.949
21	6	65.266	3245.96997100	0.212	41.659
22	7	62.614	8418.76757800	0.527	39.966
23	8	46.949	1223.23303200	0.057	29.967
24	9	61.210	2266.70214800	0.139	39.070
25	10	49.056	3639.56372100	0.179	31.312
26	11	57.868	3771.37329100	0.218	36.937
27	12	52.386	1408.23791500	0.074	33.438
28	Sum	41.359	82.54647200	0.003	26.399

Abbildung 19: Exemplarische Darstellung der *scoring analysis*.

a) Zu Beginn der *scoring analysis* erfolgt die Einstellung der Bildparameter:

Die Werte sind der oberen linken Ecke des Bildes zu entnehmen: Belichtungszeit: 28,2 ms, Verstärkung 1,0x und Farbsättigung 1,5x, Werte der Schieberegler (von oben nach unten): 30 - 1 - 0. Anschließend wird die aktuelle Konfiguration unter der Bezeichnung „Scoring20x“ gespeichert. Für die Vergleichbarkeit des *score values* verschiedener Präparate ist es entscheidend, die einmal festgelegten Parameter für jedes weitere zu untersuchende Präparat identisch einzustellen. Änderungen an den Einstellungen des Mikroskops dürfen zwischenzeitlich auch nicht vorgenommen werden. Die Durchführung der *scoring analysis* erfolgt in diesem Fall unter der Verwendung des 20x Objektivs.

b)/c) Festlegung des Referenzgrauwertes durch Aufsuchen der Stelle der maximalen Färbeintensität im Präparat:

Der Referenzgrauwert beträgt in diesem Beispiel „205“ und taucht in der Excel-Datei [Bild h)] unter dem Feld „*Intensity Mean*“ auf. Dieser Farbton wird von dem Programm gleich 100 % Färbeintensität gesetzt und alle folgenden Messungen werden von dem Computerprogramm in Korrelation zu diesem Referenzwert betrachtet. Ein Wert von 200 ± 20 ist hierbei als optimal anzusehen, kann jedoch aufgrund der Heterogenität sowohl der Präparate als auch des immunhistochemischen Färbeergebnisses nicht immer erreicht werden.

d)-g) Ablauf der eigentlichen *scoring analysis* für ein Beispielbild:

Es folgt die Detektion sämtlicher Rottöne in dem vorliegenden Bildausschnitt des Präparates [Bilder d) und e)]. Artefakte sowie Lungenrandbereiche werden unter Verwendung eines „Scheren-Tools“ ausgespart und so durch das Programm bei der Berechnung der Werte nicht berücksichtigt. Bild f) zeigt das vorläufige Messergebnis. Fällt dieses zufriedenstellend aus, so werden die Werte in die Excel-Datei [Bild h)] transferiert; Bild g) entspricht in diesem Fall dem neben der Nativaufnahme gespeicherten finalen Ergebnisbild. Soll das vorläufige Messergebnis aus Bild f) jedoch korrigiert werden, so stehen hierfür weitere „Tools“ zur Verfügung. Nach zufriedenstellender Korrektur wird analog zu einem initial zufriedenstellenden Messergebnis verfahren.

Die Schritte d)-g) repräsentieren den eigentlichen Ablauf der *scoring analysis* und werden auf jeden Ausschnitt des Präparates angewendet.

h) Struktur der Excel-Ergebnisdatei.

In der Excel-Ergebnisdatei erfolgt die chronologische Auflistung aller gemessenen Bildausschnitte („*Image*“) mit den jeweils zugehörigen Messwerten für die Punkte „*Intensity Mean*“ [0...255], „*Area*“ [μm^2], „*Intensity Sum*“ [$\text{Area mm}^2 \times \text{Intensity Sum}$], „*Intensity*“ [%] und „*Area*“ [%]. Aus diesen Werten werden von dem Programm die jeweiligen Mittelwerte (hellblau hinterlegt) berechnet: *Scoring* [0...255], *Scoring* [%], *Score Value* [%] und *Area* [%].

Der für diese Untersuchung interessante Wert ist der *score value* [%] des entsprechenden Präparates. Im Beispiel beträgt er 0,50.

Neben dem Referenzgrauwert (*Intensity Mean*) sind zusätzlich noch die insgesamt gemessene Fläche (*Meas. images field sum.* in mm^2) und die Anzahl der gemessenen Bilder (*Images*) aufgeführt.

8 LITERATURVERZEICHNIS

1. **Schiebler TH, Korf HW.** *Anatomie: Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie, Topographie.* Heidelberg : Steinkopff Verlag, 2007. 10. Auflage. ISBN 978-3-7985-1770-7.
2. **Paulsen F, Waschke J [Hrsg].** *Sobotta: Atlas der Anatomie des Menschen.* München : Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag, 2010. Bd. 2 Innere Organe, 23. Auflage. ISBN 978-3-437-44072-4.
3. **Freyschmidt J, Galanski M [Hrsg].** *Handbuch diagnostische Radiologie.* Berlin, Heidelberg, New York : Springer-Verlag, 2003. Bd. 4: Thorax. ISBN 3-540-41421-5.
4. **Silbernagl S, Despopoulos A.** *Taschenatlas Physiologie.* Stuttgart, New York : Georg Thieme Verlag, 2007. 7. Auflage. ISBN 978-3-13-567707-1.
5. **Klinke R, Pape HC, Silbernagl S [Hrsg].** *Physiologie.* Stuttgart, New York : Georg Thieme Verlag, 2005. 5. Auflage. ISBN 3-13-796005-3.
6. **Welsch U, Deller T.** *Sobotta Lehrbuch Histologie: Unter Mitarbeit von Thomas Deller.* München : Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag, 2010. 3. Auflage. ISBN 978-3-437-44431-9.
7. **Aumüller G, Aust G, Doll A, Engele J, Kirsch J, Mense S, Reißig D, Salvetter J, Schmidt W, Schmitz F, Schulte E, Spaniel-Borowski K, Wolff W, Wurzinger LJ, Zilch HG.** *Duale Reihe Anatomie.* Stuttgart : Georg Thieme Verlag, 2010. 2. Auflage. ISBN 978-3-13-136042-7.
8. **Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Schäfer-Korting M.** *Mutschler Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie.* Stuttgart : Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 2001. 8. Auflage. ISBN 3-80-471763-2.
9. **Behrends JC, Bischofberger J, Deutzmann R, Ehmke H, Frings S, Grissmer S, Hoth M, Kurtz A, Leipziger J, Müller F, Pedain C, Rettig J, Wagner C, Wischmeyer E.** *Duale Reihe Physiologie.* Stuttgart : Georg Thieme Verlag, 2010. ISBN 978-3-138411-9.
10. **Wang Z, Chesler NC.** Pulmonary vascular mechanics: important contributors to the increased right ventricular afterload of pulmonary hypertension. *Exp Physiol.* Aug 2013, Bd. 98, 8, S. 1267-73.
11. **Kühnel W.** *Taschenatlas Histologie: 750 mikroskopische Aufnahmen mit ausführlichen Bildbeschreibungen.* Stuttgart, New York : Georg Thieme Verlag, 2008. 12. Auflage. ISBN 978-3-13-168432-5.

12. **Mandegar M, Fung YC, Huang W, Remillard CV, Rubin LJ, Yuan JX.** Cellular and molecular mechanisms of pulmonary vascular remodeling: role in the development of pulmonary hypertension. *Microvasc Res.* Sep 2004, Bd. 68, 2, S. 75-103.
13. **Morrell NW, Wilkins MR.** Genetic and molecular mechanisms of pulmonary hypertension. *Clin Med (Lond).* Mar-Apr 2001, Bd. 1, 2, S. 138-45.
14. **Baldi F, Fuso L, Arrighi E, Valente S.** Optimal management of pulmonary arterial hypertension: prognostic indicators to determine treatment course. *Ther Clin Risk Manag.* Oct 2014, Bd. 10, S. 825-39.
15. **Silbernagl S, Lang F.** *Taschenatlas Pathophysiologie.* Stuttgart : Georg Thieme Verlag, 2013. 4. Auflage. ISBN 978-3-13-102194-6.
16. **Weisel FC.** *Identifizierung und Charakterisierung molekularer Mechanismen vaskulärer Umbauprozesse bei pulmonaler Hypertonie.* Gießen : s.n., 2012. [Inauguraldissertation].
17. **Euler U, Liljestrand G.** Observations on the pulmonary arterial blood pressure in the cat. *Acta Physiol Scand.* 1946, Bd. 12, S. 301-20.
18. **Wadsworth RM.** Vasoconstrictor and vasodilator effects of hypoxia. *Trends Pharmacol Sci.* Feb 1994, Bd. 15, 2, S. 47-53.
19. **Weir EK, Archer SL.** The mechanism of acute hypoxic pulmonary vasoconstriction: the tale of two channels. *FASEB J.* Feb 1995, Bd. 9, 2, S. 183-9.
20. **Weissmann N, Dietrich A, Fuchs B, Kalwa H, Ay M, Dumitrascu R, Olschewski A, Storch U, Mederos y Schnitzler M, Ghofrani HA, Schermuly RT, Pinkenburg O, Seeger W, Grimminger F, Gudermann T.** Classical transient receptor potential channel 6 (TRPC6) is essential for hypoxic pulmonary vasoconstriction and alveolar gas exchange. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Dec 2006, Bd. 103, 50, S. 19093-8.
21. **Weissmann N, Sommer N, Schermuly RT, Ghofrani HA, Seeger W, Grimminger F.** Oxygen sensors in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Cardiovasc Res.* Sep 2006, Bd. 71, 4, S. 620-9.
22. **Herget J, Suggett AJ, Leach E, Barer GR.** Resolution of pulmonary hypertension and other features induced by chronic hypoxia in rats during complete and intermittent normoxia. *Thorax.* Aug 1978, Bd. 33, 4, S. 468-73.
23. **Weissmann N, Grimminger F, Olschewski A, Seeger W.** Hypoxic pulmonary vasoconstriction: a multifactorial response? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* Aug 2001, Bd. 281, 2, S. L314-7.
24. **Sartori C, Allemann Y, Trueb L, Delabays A, Nicod P, Scherrer U.** Augmented vasoreactivity in adult life associated with perinatal vascular insult. *Lancet.* Jun 1999, Bd. 353, 9171, S. 2205-7.

-
25. **Stenmark KR, Fagan KA, Frid MG.** Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling: cellular and molecular mechanisms. *Circ Res.* Sep 2006, Bd. 99, 7, S. 675-91.
26. **Galiè N, Palazzini M, Manes A.** Pulmonary hypertension and pulmonary arterial hypertension: a clarification is needed. *Eur Respir J.* Nov 2010, Bd. 36, 5, S. 986-90.
27. **Hoeper MM, Bogaard HJ, Condliffe R, Frantz R, Khanna D, Kurzyna M, Langleben D, Manes A, Satoh T, Torres F, Wilkins MR, Badesch DB.** Definitions and diagnosis of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol.* Dec 2013, Bd. 62, (25 Suppl), S. D42-50.
28. **Kovacs G, Berghold A, Scheidl S, Olschewski H.** Pulmonary arterial pressure during rest and exercise in healthy subjects: a systematic review. *Eur Respir J.* Oct 2009, Bd. 34, 4, S. 888-94.
29. **Palazzini M, Manes A, Negro L, Marinelli A, Leci E, Gambetti S, Bachetti C, Beciani E, Conficoni E, Branzi A, Galiè N.** Pulmonary arterial hypertension. Part I: pathobiologic, pathophysiologic, clinical and diagnostic aspects. *G Ital Cardiol (Rome).* May 2009, Bd. 10, 5, S. 271-300.
30. **D'Alonzo GE, Barst RJ, Ayres SM, Bergofsky EH, Brundage BH, Detre KM, Fishman AP, Goldring RM, Groves BM, Kernis JT, Levy PS, Pietra GG, Reid LM, Reeves JT, Rich S, Vreim CE, Williams GW, Wu M.** Survival in patients with primary pulmonary hypertension. Results from a national prospective registry. *Ann Intern Med.* Sep 1991, Bd. 115, 5, S. 343-9.
31. **Galiè N, Hoeper MM, Humbert M, Torbicki A, Vachiery JL, Barbera JA, Beghetti M, Corris P, Gaine S, Gibbs JS, Gomez-Sanchez MA, Jondeau G, Klepetko W, Opitz C, Peacock A, Rubin L, Zellweger M, Simonneau G.** Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. *Eur Respir J.* Dec 2009, Bd. 34, 6, S. 1219-63.
32. **Renner MK, Lang I.** Aktuelle Aspekte der Pulmonalen Hypertonie. *J Kardiol.* 2010, Bd. 17, 7-8, S. 293-9.
33. **Humbert M, Trembath RC.** Genetics of pulmonary hypertension: from bench to bedside. *Eur Respir J.* Sep 2002, Bd. 20, 3, S. 741-9.
34. **Heresi GA, Dweik RA.** Pulmonary hypertension: evaluation and management. *Compr Ther.* 2007, Bd. 33, 3, S. 150-61.
35. **Olschewski H, Hoeper MM, Borst MM, Ewert R, Grünig E, Kleber FX, Kopp B, Opitz C, Reichenberger F, Schmeisser A, Schranz D, Schulze-Neick I, Wilkens H, Winkler J, Worth H.** Diagnosis and therapy of chronic pulmonary hypertension. *Pneumologie.* Dec 2006, Bd. 60, 12, S. 749-71.

-
36. **Simonneau G, Gatzoulis MA, Adatia I, Celermajer D, Denton C, Ghofrani A, Gomez Sanchez MA, Krishna Kumar R, Landzberg M, Machado RF, Olschewski H, Robbins IM, Souza R.** Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol.* Dec 2013, Bd. 62, (25 Suppl), S. D34-41.
37. **Schermuly RT, Ghofrani HA, Wilkins MR, Grimminger F.** Mechanisms of disease: pulmonary arterial hypertension. *Nat Rev Cardiol.* Jun 2011, Bd. 8, 8, S. 443-55.
38. **Christman BW, McPherson CD, Newman JH, King GA, Bernard GR, Groves BM, Loyd JE.** An imbalance between the excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites in pulmonary hypertension. *N Engl J Med.* Jul 1992, Bd. 327, 2, S. 70-5.
39. **Launay JM, Hervé P, Peoc'h K, Tournois C, Callebert J, Nebigil CG, Etienne N, Drouet L, Humbert M, Simonneau G, Maroteaux L.** Function of the serotonin 5-hydroxytryptamine 2B receptor in pulmonary hypertension. *Nat Med.* Oct 2002, Bd. 8, 10, S. 1129-35.
40. **Eddahibi S, Guignabert C, Barlier-Mur AM, Dewachter L, Fadel E, Darteville P, Humbert M, Simonneau G, Hanoun N, Saurini F, Hamon M, Adnot S.** Cross talk between endothelial and smooth muscle cells in pulmonary hypertension: critical role for serotonin-induced smooth muscle hyperplasia. *Circulation.* Apr 2006, Bd. 113, 15, S. 1857-64.
41. **Moudgil R, Michelakis ED, Archer SL.** The role of K^+ channels in determining pulmonary vascular tone, oxygen sensing, cell proliferation, and apoptosis: implications in hypoxic pulmonary vasoconstriction and pulmonary arterial hypertension. *Microcirculation.* Dec 2006, Bd. 13, 8, S. 615-32.
42. **Davie N, Haleen SJ, Upton PD, Polak JM, Yacoub MH, Morrell NW, Wharton J.** ET(A) and ET(B) receptors modulate the proliferation of human pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Respir Crit Care Med.* Feb 2002, Bd. 165, 3, S. 398-405.
43. **Burg ED, Remillard CV, Yuan JX.** Potassium channels in the regulation of pulmonary artery smooth muscle cell proliferation and apoptosis: pharmacotherapeutic implications. *Br J Pharmacol.* Mar 2008, Bd. 153, (1 Suppl), S. S99-S111.
44. **Tuder RM, Yun JH.** Vascular endothelial growth factor of the lung: friend or foe. *Curr Opin Pharmacol.* Jun 2008, Bd. 8, 3, S. 255-60.
45. **Moreno-Vinasco L, Gomberg-Maitland M, Maitland ML, Desai AA, Singleton PA, Sammani S, Sam L, Liu Y, Husain AN, Lang RM, Ratain MJ, Lussier YA, Garcia JG.** Genomic assessment of a multikinase inhibitor, sorafenib, in a rodent model of pulmonary hypertension. *Physiol Genomics.* Apr 2008, Bd. 33, 2, S. 278-91.

46. **Ono M, Sawa Y, Mizuno S, Fukushima N, Ichikawa H, Bessho K, Nakamura T, Matsuda H.** Hepatocyte growth factor suppresses vascular medial hyperplasia and matrix accumulation in advanced pulmonary hypertension of rats. *Circulation*. Nov 2004, Bd. 110, 18, S. 2896-902.
47. **Lepetit H, Eddahibi S, Fadel E, Frisdal E, Munaut C, Noel A, Humbert M, Adnot S, D'Ortho MP, Lafuma C.** Smooth muscle cell matrix metalloproteinases in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J*. May 2005, Bd. 25, 5, S. 834-42.
48. **Eddahibi S, Morrell N, d'Ortho MP, Naeije R, Adnot S.** Pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J*. Dec 2002, Bd. 20, 6, S. 1559-72.
49. **Li X, Zhang X, Leathers R, Makino A, Huang C, Parsa P, Macias J, Yuan JX, Jamieson SW, Thistlethwaite PA.** Notch3 signaling promotes the development of pulmonary arterial hypertension. *Nat Med*. Nov 2009, Bd. 15, 11, S. 1289-97.
50. **Alva JA, Iruela-Arispe ML.** Notch signaling in vascular morphogenesis. *Curr Opin Hematol*. Jul 2004, Bd. 11, 4, S. 278-83.
51. **Gustafsson MV, Zheng X, Pereira T, Gradin K, Jin S, Lundkvist J, Ruas JL, Poellinger L, Lendahl U, Bondesson M.** Hypoxia requires notch signaling to maintain the undifferentiated cell state. *Dev Cell*. Nov 2005, Bd. 9, 5, S. 617-28.
52. **Jin S, Hansson EM, Tikka S, Lanner F, Sahlgren C, Farnebo F, Baumann M, Kalimo H, Lendahl U.** Notch signaling regulates platelet-derived growth factor receptor-beta expression in vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. Jun 2008, Bd. 102, 12, S. 1483-91.
53. **Matsuda Y, Hoshikawa Y, Ameshima S, Suzuki S, Okada Y, Tabata T, Sugawara T, Matsumura Y, Kondo T.** Effects of peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands on monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats [Japanese]. *Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi*. May 2005, Bd. 43, 5, S. 283-8.
54. **Guignabert C, Alvira CM, Alastalo TP, Sawada H, Hansmann G, Zhao M, Wang L, El-Bizri N, Rabinovitch M.** Tie2-mediated loss of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in mice causes PDGF receptor-beta-dependent pulmonary arterial muscularization. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. Dec 2009, Bd. 297, 6, S. L1082-90.
55. **Duan SZ, Usher MG, Mortensen RM.** Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-mediated effects in the vasculature. *Circ Res*. Feb 2008, Bd. 102, 3, S. 283-94.

-
56. **Hassoun PM, Mouthon L, Barberà JA, Eddahibi S, Flores SC, Grimminger F, Jones PL, Maitland ML, Michelakis ED, Morrell NW, Newman JH, Rabinovitch M, Schermuly R, Stenmark KR, Voelkel NF, Yuan JX, Humbert M.** Inflammation, growth factors, and pulmonary vascular remodeling. *J Am Coll Cardiol.* Jun 2009, Bd. 54, (1 Suppl), S. 10-9.
57. **Tuder RM, Groves B, Badesch DB, Voelkel NF.** Exuberant endothelial cell growth and elements of inflammation are present in plexiform lesions of pulmonary hypertension. *Am J Pathol.* Feb 1994, Bd. 144, 2, S. 275-85.
58. **Itoh T, Nagaya N, Ishibashi-Ueda H, Kyotani S, Oya H, Sakamaki F, Kimura H, Nakanishi N.** Increased plasma monocyte chemoattractant protein-1 level in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Respirology.* Mar 2006, Bd. 11, 2, S. 158-63.
59. **Humbert M, Monti G, Brenot F, Sitbon O, Portier A, Grangeot-Keros L, Duroux P, Galanaud P, Simonneau G, Emilie D.** Increased interleukin-1 and interleukin-6 serum concentrations in severe primary pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* May 1995, Bd. 151, 5, S. 1628-31.
60. **Zlotnik A, Yoshie O.** Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity.* Feb 2000, Bd. 12, 2, S. 121-7.
61. **Johnson SR, Granton JT, Mehta S.** Thrombotic arteriopathy and anticoagulation in pulmonary hypertension. *Chest.* Aug 2006, Bd. 130, 2, S. 545-52.
62. **Tournier A, Wahl D, Chaouat A, Max JP, Regnault V, Lecompte T, Chabot F.** Calibrated automated thrombography demonstrates hypercoagulability in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Thromb Res.* Dec 2010, Bd. 126, 6, S. e418-22.
63. **White RJ, Meoli DF, Swarthout RF, Kallop DY, Galaria II, Harvey JL, Miller CM, Blaxall BC, Hall CM, Pierce RA, Cool CD, Taubman MB.** Plexiform-like lesions and increased tissue factor expression in a rat model of severe pulmonary arterial hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* Sep 2007, Bd. 293, 3, S. L583-90.
64. **Rabinovitch M.** Pathobiology of pulmonary hypertension. *Annu Rev Pathol.* 2007, Bd. 2, S. 369-99.
65. **Jeffery TK, Wanstall JC.** Pulmonary vascular remodeling: a target for therapeutic intervention in pulmonary hypertension. *Pharmacol Ther.* Oct 2001, Bd. 92, 1, S. 1-20.
66. **Rounds S, Hill NS.** Pulmonary hypertensive diseases. *Chest.* Mar 1984, Bd. 85, 3, S. 397-405.

67. **Meyrick B, Reid L.** Hypoxia-induced structural changes in the media and adventitia of the rat hilar pulmonary artery and their regression. *Am J Pathol.* Jul 1980, Bd. 100, 1, S. 151-78.
68. **Humbert M.** Pulmonary arterial hypertension and chronic thromboembolic pulmonary hypertension: pathophysiology. *Eur Respir Rev.* Mar 2010, Bd. 19, 115, S. 59-63.
69. **Peacock A, Simonneau G, Rubin L.** Controversies, uncertainties and future research on the treatment of chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Proc Am Thorac Soc.* Sep 2006, Bd. 3, 7, S. 608-14.
70. **Egermayer P, Peacock AJ.** Is pulmonary embolism a common cause of chronic pulmonary hypertension? Limitations of the embolic hypothesis. *Eur Respir J.* Mar 2000, Bd. 15, 3, S. 440-8.
71. **Moser KM, Bloor CM.** Pulmonary vascular lesions occurring in patients with chronic major vessel thromboembolic pulmonary hypertension. *Chest.* Mar 1993, Bd. 103, 3, S. 685-92.
72. **Hoeper MM, Mayer E, Simonneau G, Rubin LJ.** Chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Circulation.* Apr 2006, Bd. 113, 16, S. 2011-20.
73. **Lalich JJ, Merkow L.** Pulmonary arteritis produced in rat by feeding *Crotalaria spectabilis*. *Lab Invest.* Jul-Aug 1961, Bd. 10, S. 744-50.
74. **Schultze AE, Roth RA.** Chronic pulmonary hypertension--the monocrotaline model and involvement of the hemostatic system. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.* Oct-Dec 1998, Bd. 1, 4, S. 271-346.
75. **Kashara Y, Kiyatake K, Tatsumi K, Subito K, Kakusaka I, Yamagata S, Ohmori S, Kitada M, Kuriyama T.** Bioactivation of monocrotaline by P-450 3A in rat liver. *J Cardiovasc Pharmacol.* Jul 1997, Bd. 30, 1, S. 124-9.
76. **Hoorn CM, Wagner JG, Roth RA.** Effects of monocrotaline pyrrole on cultured rat pulmonary endothelium. *Toxicol Appl Pharmacol.* Jun 1993, Bd. 120, 2, S. 281-7.
77. **Sugita T, Hyers TM, Dauber IM, Wagner WW, McMurtry IF, Reeves JT.** Lung vessel leak precedes right ventricular hypertrophy in monocrotaline-treated rats. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol.* Feb 1983, Bd. 54, 2, S. 371-4.
78. **Ghods F, Will JA.** Changes in pulmonary structure and function induced by monocrotaline intoxication. *Am J Physiol.* Feb 1981, Bd. 240, 2, S. H149-55.
79. **Reindel JF, Ganey PE, Wagner JG, Slocombe RF, Roth RA.** Development of morphologic, hemodynamic, and biochemical changes in lungs of rats given monocrotaline pyrrole. *Toxicol Appl Pharmacol.* Nov 1990, Bd. 106, 2, S. 179-200.

-
80. **Alexandru B, Bogdan MA.** Monocrotaline induce pulmonary hypertension in animal models. *Pneumologia*. Apr-Jun 2001, Bd. 50, 2, S. 85-9.
81. **Dony E.** *Dualelektive Phosphodiesterase 3 und 4 Inhibition in experimenteller pulmonaler Hypertonie*. Gießen : s.n., 2009. [Inauguraldissertation].
82. **Stenmark KR, Meyrick B, Galie N, Mooi WJ, McMurtry IF.** Animal models of pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological discovery and pharmacological cure. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. Dec 2009, Bd. 297, 6, S. L1013-32.
83. **Meyrick BO, Perkett EA.** The sequence of cellular and hemodynamic changes of chronic pulmonary hypertension induced by hypoxia and other stimuli. *Am Rev Respir Dis*. Nov 1989, Bd. 140, 5, S. 1486-9.
84. **Mandegar M, Thistlethwaite PA, Yuan JX.** Molecular biology of primary pulmonary hypertension. *Cardiol Clin*. Aug 2004, Bd. 22, 3, S. 417-29, vi.
85. **Burke DL, Frid MG, Kunrath CL, Karoor V, Anwar A, Wagner BD, Strassheim D, Stenmark KR.** Sustained hypoxia promotes the development of a pulmonary artery-specific chronic inflammatory microenvironment. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. Aug 2009, Bd. 297, 2, S. L238-50.
86. **Pak O, Janssen W, Ghofrani HA, Seeger W, Grimminger F, Schermuly RT, Weissmann N.** Animal models of pulmonary hypertension: role in translational research. *Drug Discov Today Dis Models*. 2010, Bd. 7, S. 89–97.
87. **Abraham AS, Kay JM, Cole RB, Pincock AC.** Haemodynamic and pathological study of the effect of chronic hypoxia and subsequent recovery of the heart and pulmonary vasculature of the rat. *Cardiovasc Res*. Jan 1971, Bd. 5, 1, S. 95-102.
88. **Chin KM, Rubin LJ.** Pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol*. Apr 2008, Bd. 51, 16, S. 1527-38.
89. **Arastéh K, Baenkler HW, Bieber C, Brandt R, Chatterjee T, Dill T, Ditting T, Eich W, Ernst S, Fischli S, Fleck R, Fritze D, Fießl HS, Hahn JM, Hamm CW, Harenberg J, Hengstmann JH, Herzog W, Hofmann T, Holstege A, Huck K, Kähler J, Keller M, et al.** *Duale Reihe Innere Medizin*. Stuttgart : Georg Thieme Verlag, 2012. 3. Auflage. ISBN 978-3-13-118163-3.
90. **Herold G und Mitarbeiter.** *Innere Medizin 2014*. Köln : Gerd Herold, 2013. ISBN 978-3-9814660-3-4.
91. **Waddell TK, Bennett L, Kennedy R, Todd TR, Keshavjee SH.** Heart-lung or lung transplantation for Eisenmenger syndrome. *J Heart Lung Transplant*. Jul 2002, Bd. 21, 7, S. 731-7.
92. **Fießl HS, Middecke M.** *Duale Reihe Anamnese und Klinische Untersuchung*. Stuttgart : Georg Thieme Verlag, 2010. 4. Auflage. ISBN 978-3-13-126884-6.

-
93. **Heresi GA, Tang WH, Aytakin M, Hammel J, Hazen SL, Dweik RA.** Sensitive cardiac troponin I predicts poor outcomes in pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J.* Apr 2012, Bd. 39, 4, S. 939-44.
94. **Gan CT, McCann GP, Marcus JT, van Wolferen SA, Twisk JW, Boonstra A, Postmus PE, Vonk-Noordegraaf A.** NT-proBNP reflects right ventricular structure and function in pulmonary hypertension. *Eur Respir J.* Dec 2006, Bd. 28, 6, S. 1190-4.
95. **Calvier L, Legchenko E, Grimm L, Sallmon H, Hatch A, Plouffe BD, Schroeder C, Bauersachs J, Murthy SK, Hansmann G.** Galectin-3 and aldosterone as potential tandem biomarkers in pulmonary arterial hypertension. *Heart.* Mar 2016, Bd. 102, 5, S. 390-6.
96. **Tiede SL, Gall H, Dörr O, Troidl C, Liebetrau C, Voss S, Voswinckel R, Schermuly RT, Seeger W, Grimminger F, Zeiher AM, Dimmeler S, Möllmann H, Hamm CW, Ghofrani HA, Nef HM.** New potential diagnostic biomarkers for pulmonary hypertension. *Eur Respir J.* Nov 2015, Bd. 46, 5, S. 1390-6.
97. **Schannwell CM, Steiner S, Strauer BE.** Diagnostics in pulmonary hypertension. *J Physiol Pharmacol.* Nov 2007, Bd. 58, Suppl 5 (Pt 2), S. 591-602.
98. **Reiser M, Kuhn FP, Debus J [Hrsg].** *Duale Reihe Radiologie.* Stuttgart : Georg Thieme Verlag, 2011. 3. Auflage. ISBN 978-3-13-125323-1.
99. **Bossone E, Bordini BD, Mazza A, Allegra L.** Pulmonary arterial hypertension: the key role of echocardiography. *Chest.* May 2005, Bd. 127, 5, S. 1836-43.
100. **Nauser TD, Stites SW.** Diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. *Am Fam Physician.* May 2001, Bd. 63, 9, S. 1789-98.
101. **Marcus JT, Gan CT, Zwanenburg JJ, Boonstra A, Allaart CP, Götte MJ, Vonk-Noordegraaf A.** Interventricular mechanical asynchrony in pulmonary arterial hypertension: left-to-right delay in peak shortening is related to right ventricular overload and left ventricular underfilling. *J Am Coll Cardiol.* Feb 2008, Bd. 51, 7, S. 750-7.
102. **Budev MM, Arroliga AC, Jennings CA.** Diagnosis and evaluation of pulmonary hypertension. *Cleve Clin J Med.* Apr 2003, Bd. 70, (1 Suppl), S. 9-17.
103. **Kim NH, Delcroix M, Jenkins DP, Channick R, Darteville P, Jansa P, Lang I, Madani MM, Ogino H, Pengo V, Mayer E.** Chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol.* Dec 2013, Bd. 62, (25 Suppl), S. D92-9.
104. **Reichelt A, Hoeper MM, Galanski M, Keberle M.** Chronic thromboembolic pulmonary hypertension: evaluation with 64-detector row CT versus digital subtraction angiography. *Eur J Radiol.* Jul 2009, Bd. 71, 1, S. 49-54.

105. **Sitbon O, Humbert M, Jaïs X, Ioos V, Hamid AM, Provencher S, Garcia G, Parent F, Hervé P, Simonneau G.** Long-term response to calcium channel blockers in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Circulation*. Jun 2005, Bd. 111, 23, S. 3105-11.
106. **Rich S, Kaufmann E, Levy PS.** The effect of high doses of calcium-channel blockers on survival in primary pulmonary hypertension. *N Engl J Med*. Jul 1992, Bd. 327, 2, S. 76-81.
107. **Galiè N, Palazzini M, Leci E, Manes A.** Current therapeutic approaches to pulmonary arterial hypertension. *Rev Esp Cardiol*. Jun 2010, Bd. 63, 6, S. 708-24.
108. **Jones DA, Benjamin CW, Linseman DA.** Activation of thromboxane and prostacyclin receptors elicits opposing effects on vascular smooth muscle cell growth and mitogen-activated protein kinase signaling cascades. *Mol Pharmacol*. Nov 1995, Bd. 48, 5, S. 890-6.
109. **Humbert M, Ghofrani HA.** The molecular targets of approved treatments for pulmonary arterial hypertension. *Thorax*. Jan 2016, Bd. 71, 1, S. 73-83.
110. **Barnett CF, Machado RF.** Sildenafil in the treatment of pulmonary hypertension. *Vasc Health Risk Manag*. 2006, Bd. 2, 4, S. 411-22.
111. **Trow TK, Taichman DB.** Endothelin receptor blockade in the management of pulmonary arterial hypertension: selective and dual antagonism. *Respir Med*. Jul 2009, Bd. 103, 7, S. 951-62.
112. **Stewart DJ, Levy RD, Cernacek P, Langleben D.** Increased plasma endothelin-1 in pulmonary hypertension: marker or mediator of disease? *Ann Intern Med*. Mar 1991, Bd. 114, 6, S. 464-9.
113. **Steiner MK, Preston IR.** Optimizing endothelin receptor antagonist use in the management of pulmonary arterial hypertension. *Vasc Health Risk Manag*. 2008, Bd. 4, 5, S. 943-52.
114. **Kosanovic D, Kojonazarov B, Luitel H, Dahal BK, Sydykov A, Cornitescu T, Janssen W, Brandes RP, Davie N, Ghofrani HA, Weissmann N, Grimminger F, Seeger W, Schermuly RT.** Therapeutic efficacy of TBC3711 in monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Respir Res*. Jun 2011, Bd. 12, 87, S. 1-13.
115. **Komuro I, Kurihara H, Sugiyama T, Yoshizumi M, Takaku F, Yazaki Y.** Endothelin stimulates c-fos and c-myc expression and proliferation of vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett*. Oct 1988, Bd. 238, 2, S. 249-52.
116. **Pepke-Zaba J, Morrell NW.** The endothelin system and its role in pulmonary arterial hypertension (PAH). *Thorax*. Jun 2005, Bd. 60, 6, S. 443-4.

117. **Al Maluli H, DeStephan CM, Alvarez RJ Jr, Sandoval J.** Atrial Septostomy: A Contemporary Review. *Clin Cardiol.* Jun 2015, Bd. 38, 6, S. 395-400.
118. **Reichenberger F, Pepke-Zaba J, McNeil K, Parameshwar J, Shapiro LM.** Atrial septostomy in the treatment of severe pulmonary arterial hypertension. *Thorax.* Sep 2003, Bd. 58, 9, S. 797-800.
119. **Auger WR, Fedullo PF.** Chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Semin Respir Crit Care Med.* Aug 2009, Bd. 30, 4, S. 471-83.
120. **Daily PO, Dembitsky WP, Iversen S.** Technique of pulmonary thromboendarterectomy for chronic pulmonary embolism. *J Card Surg.* Mar 1989, Bd. 4, 1, S. 10-24.
121. **Feinstein JA, Goldhaber SZ, Lock JE, Ferndandes SM, Landzberg MJ.** Balloon pulmonary angioplasty for treatment of chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Circulation.* Jan 2001, Bd. 103, 1, S. 10-3.
122. **Kurzyna M, Darocha S, Koteja A, Pietura R, Torbicki A.** Balloon pulmonary angioplasty for chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Postepy Kardiol Interwencyjnej.* 2015, Bd. 11, 1, S. 1-4.
123. **Bando K, Armitage JM, Paradis IL, Keenan RJ, Hardesty RL, Konishi H, Komatsu K, Stein KL, Shah AN, Bahnson HT, et al.** Indications for and results of single, bilateral, and heart-lung transplantation for pulmonary hypertension. *J Thorac Cardiovasc Surg.* Dec 1994, Bd. 108, 6, S. 1056-65.
124. **Mittendorf J, Weigand S, Alonso-Alija C, Bischoff E, Feurer A, Gerisch M, Kern A, Knorr A, Lang D, Muentner K, Radtke M, Schirok H, Schlemmer KH, Stahl E, Straub A, Wunder F, Stasch JP.** Discovery of riociguat (BAY 63-2521): a potent, oral stimulator of soluble guanylate cyclase for the treatment of pulmonary hypertension. *ChemMedChem.* May 2009, Bd. 4, 5, S. 853-65.
125. **Kim NH.** Riociguat: an upcoming therapy in chronic thromboembolic pulmonary hypertension? *Eur Respir Rev.* Mar 2010, Bd. 19, 115, S. 68-71.
126. **Xing XQ, Gan Y, Wu SJ, Chen P, Zhou R, Xiang XD.** Rho-kinase as a potential therapeutic target for the treatment of pulmonary hypertension. *Drug News Perspect.* Nov 2006, Bd. 19, 9, S. 517-22.
127. **Fukumoto Y, Tawara S, Shimokawa H.** Recent progress in the treatment of pulmonary arterial hypertension: expectation for rho-kinase inhibitors. *Tohoku J Exp Med.* Apr 2007, Bd. 211, 4, S. 309-20.
128. **Hu J, Xu Q, McTiernan C, Lai YC, Osei-Hwedieh D, Gladwin M.** Novel Targets of Drug Treatment for Pulmonary Hypertension. *Am J Cardiovasc Drugs.* Aug 2015, Bd. 15, 4, S. 225-34.

129. **Gomberg-Maitland M, Bull TM, Saggarr R, Barst RJ, Elgazayerly A, Fleming TR, Grimminger F, Rainisio M, Stewart DJ, Stockbridge N, Ventura C, Ghofrani AH, Rubin LJ.** New trial designs and potential therapies for pulmonary artery hypertension. *J Am Coll Cardiol.* Dec 2013, Bd. 62, (25 Suppl), S. D82-91.
130. **Cohen MH, Williams G, Johnson JR, Duan J, Gobburu J, Rahman A, Benson K, Leighton J, Kim SK, Wood R, Rothmann M, Chen G, U KM, Staten AM, Pazdur R.** Approval summary for imatinib mesylate capsules in the treatment of chronic myelogenous leukemia. *Clin Cancer Res.* May 2002, Bd. 8, 5, S. 935-42.
131. **Dagher R, Cohen M, Williams G, Rothmann M, Gobburu J, Robbie G, Rahman A, Chen G, Staten A, Griebel D, Pazdur R.** Approval summary: imatinib mesylate in the treatment of metastatic and/or unresectable malignant gastrointestinal stromal tumors. *Clin Cancer Res.* Oct 2002, Bd. 8, 10, S. 3034-8.
132. **Schermuly RT, Dony E, Ghofrani HA, Pullamsetti S, Savai R, Roth M, Sydykov A, Lai YJ, Weissmann N, Seeger W, Grimminger F.** Reversal of experimental pulmonary hypertension by PDGF inhibition. *J Clin Invest.* Oct 2005, Bd. 115, 10, S. 2811-21.
133. **Barst RJ.** PDGF signaling in pulmonary arterial hypertension. *J Clin Invest.* Oct 2005, Bd. 115, 10, S. 2691-4.
134. **Dumitrascu R, Kulcke C, Königshoff M, Kouri F, Yang X, Morrell N, Ghofrani HA, Weissmann N, Reiter R, Seeger W, Grimminger F, Eickelberg O, Schermuly RT, Pullamsetti SS.** Terguride ameliorates monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Eur Respir J.* May 2011, Bd. 37, 5, S. 1104-18.
135. **Sitbon O, Morrell N.** Pathways in pulmonary arterial hypertension: the future is here. *Eur Respir Rev.* Dec 2012, Bd. 21, 126, S. 321-7.
136. **Kulisch C.** *Therapeutischer Effekt des Serotonin-Antagonisten Tergurid im Modell der monocrotalin-induzierten pulmonalen Hypertonie der Ratte.* Gießen : s.n., 2011. [Inauguraldissertation].
137. **Drucker DJ, Sherman SI, Gorelick FS, Bergenstal RM, Sherwin RS, Buse JB.** Incretin-based therapies for the treatment of type 2 diabetes: evaluation of the risks and benefits. *Diabetes Care.* Feb 2010, Bd. 33, 2, S. 428-33.
138. **Scrocchi LA, Marshall BA, Cook SM, Brubaker PL, Drucker DJ.** Identification of glucagon-like peptide 1 (GLP-1) actions essential for glucose homeostasis in mice with disruption of GLP-1 receptor signaling. *Diabetes.* Apr 1998, Bd. 47, 4, S. 632-9.
139. **Elrick H, Stimmler L, Hlad CJ Jr, Arai Y.** Plasma insulin response to oral and intravenous glucose administration. *J Clin Endocrinol Metab.* Oct 1964, Bd. 24, S. 1076-82.

-
140. **Baggio LL, Drucker DJ.** Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology*. May 2007, Bd. 132, 6, S. 2131-57.
141. **Nauck MA, Homberger E, Siegel EG, Allen RC, Eaton RP, Ebert R, Creutzfeldt W.** Incretin effects of increasing glucose loads in man calculated from venous insulin and C-peptide responses. *J Clin Endocrinol Metab*. Aug 1986, Bd. 63, 2, S. 492-8.
142. **Trujillo JM, Nuffer W.** GLP-1 receptor agonists for type 2 diabetes mellitus: recent developments and emerging agents. *Pharmacotherapy*. Nov 2014, Bd. 34, 11, S. 1174-86.
143. **Mojsov S, Weir GC, Habener JF.** Insulinotropin: glucagon-like peptide I (7-37) co-encoded in the glucagon gene is a potent stimulator of insulin release in the perfused rat pancreas. *J Clin Invest*. Feb 1987, Bd. 79, 2, S. 616-9.
144. **White JW, Saunders GF.** Structure of the human glucagon gene. *Nucleic Acids Res*. Jun 1986, Bd. 14, 12, S. 4719-30.
145. **Mojsov S, Heinrich G, Wilson IB, Ravazzola M, Orci L, Habener JF.** Preproglucagon gene expression in pancreas and intestine diversifies at the level of post-translational processing. *J Biol Chem*. Sep 1986, Bd. 261, 25, S. 11880-9.
146. **Drucker DJ, Asa S.** Glucagon gene expression in vertebrate brain. *J Biol Chem*. Sep 1988, Bd. 263, 27, S. 13475-8.
147. **Holst JJ.** Enteroglucagon. *Annu Rev Physiol*. 1997, Bd. 59, S. 257-71.
148. **Eissele R, Göke R, Willemer S, Harthus HP, Vermeer H, Arnold R, Göke B.** Glucagon-like peptide-1 cells in the gastrointestinal tract and pancreas of rat, pig and man. *Eur J Clin Invest*. Apr 1992, Bd. 22, 4, S. 283-91.
149. **Orskov C, Holst JJ, Knuhtsen S, Baldissera FG, Poulsen SS, Nielsen OV.** Glucagon-like peptides GLP-1 and GLP-2, predicted products of the glucagon gene, are secreted separately from pig small intestine but not pancreas. *Endocrinology*. Oct 1986, Bd. 119, 4, S. 1467-75.
150. **Conlon JM.** Proglucagon-derived peptides: nomenclature, biosynthetic relationships and physiological roles. *Diabetologia*. Aug 1988, Bd. 31, 8, S. 563-6.
151. **Brubaker PL.** The glucagon-like peptides: pleiotropic regulators of nutrient homeostasis. *Ann N Y Acad Sci*. Jul 2006, Bd. 1070, S. 10-26.
152. **Rocca AS, Brubaker PL.** Role of the vagus nerve in mediating proximal nutrient-induced glucagon-like peptide-1 secretion. *Endocrinology*. Apr 1999, Bd. 140, 4, S. 1687-94.

153. **Hansen L, Hartmann B, Bisgaard T, Mineo H, Jørgensen PN, Holst JJ.** Somatostatin restrains the secretion of glucagon-like peptide-1 and -2 from isolated perfused porcine ileum. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* Jun 2000, Bd. 278, 6, S. E1010-8.
154. **Drucker DJ.** Minireview: the glucagon-like peptides. *Endocrinology.* Feb 2001, Bd. 142, 2, S. 521-7.
155. **Orskov C, Rabenhøj L, Wettergren A, Kofod H, Holst JJ.** Tissue and plasma concentrations of amidated and glycine-extended glucagon-like peptide I in humans. *Diabetes.* Apr 1994, Bd. 43, 4, S. 535-9.
156. **Kieffer TJ, McIntosh CH, Pederson RA.** Degradation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide and truncated glucagon-like peptide 1 in vitro and in vivo by dipeptidyl peptidase IV. *Endocrinology.* Aug 1995, Bd. 136, 8, S. 3585-96.
157. **Mentlein R.** Dipeptidyl-peptidase IV (CD26)--role in the inactivation of regulatory peptides. *Regul Pept.* Nov 1999, Bd. 85, 1, S. 9-24.
158. **Hansen L, Deacon CF, Orskov C, Holst JJ.** Glucagon-like peptide-1-(7-36)amide is transformed to glucagon-like peptide-1-(9-36)amide by dipeptidyl peptidase IV in the capillaries supplying the L cells of the porcine intestine. *Endocrinology.* Nov 1999, Bd. 140, 11, S. 5356-63.
159. **Nikolaidis LA, Elahi D, Shen YT, Shannon RP.** Active metabolite of GLP-1 mediates myocardial glucose uptake and improves left ventricular performance in conscious dogs with dilated cardiomyopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* Dec 2005, Bd. 289, 6, S. H2401-8.
160. **Sjöholm A.** Impact of glucagon-like peptide-1 on endothelial function. *Diabetes Obes Metab.* Dec 2009, Bd. 11, (3 Suppl), S. 19-25.
161. **Hupe-Sodmann K, McGregor GP, Bridenbaugh R, Göke R, Göke B, Thole H, Zimmermann B, Voigt K.** Characterisation of the processing by human neutral endopeptidase 24.11 of GLP-1(7-36) amide and comparison of the substrate specificity of the enzyme for other glucagon-like peptides. *Regul Pept.* Aug 1995, Bd. 58, 3, S. 149-56.
162. **Ruiz-Grande C, Alarcón C, Alcántara A, Castilla C, López Novoa JM, Villanueva-Peñacarrillo ML, Valverde I.** Renal catabolism of truncated glucagon-like peptide 1. *Horm Metab Res.* Dec 1993, Bd. 25, 12, S. 612-6.
163. **Drucker DJ, Philippe J, Mojsov S, Chick WL, Habener JF.** Glucagon-like peptide I stimulates insulin gene expression and increases cyclic AMP levels in a rat islet cell line. *Proc Natl Acad Sci USA.* May 1987, Bd. 84, 10, S. 3434-8.

164. **Holz GG 4th, Kühtreiber WM, Habener JF.** Pancreatic beta-cells are rendered glucose-competent by the insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1(7-37). *Nature*. Jan 1993, Bd. 361, 6410, S. 362-5.
165. **Kolic J, MacDonald PE.** cAMP-independent effects of GLP-1 on β cells. *J Clin Invest*. Dec 2015, Bd. 125, 12, S. 4327-30.
166. **Fehmann HC, Strowski M, Göke B.** Interaction of glucagon-like peptide-I (7-37) and somatostatin-14 on signal transduction and proinsulin gene expression in beta TC-1 cells. *Metabolism*. Jun 1994, Bd. 43, 6, S. 787-92.
167. **de Heer J, Rasmussen C, Coy DH, Holst JJ.** Glucagon-like peptide-1, but not glucose-dependent insulinotropic peptide, inhibits glucagon secretion via somatostatin (receptor subtype 2) in the perfused rat pancreas. *Diabetologia*. Dec 2008, Bd. 51, 12, S. 2263-70.
168. **Stoffers DA, Kieffer TJ, Hussain MA, Drucker DJ, Bonner-Weir S, Habener JF, Egan JM.** Insulinotropic glucagon-like peptide 1 agonists stimulate expression of homeodomain protein IDX-1 and increase islet size in mouse pancreas. *Diabetes*. May 2000, Bd. 49, 5, S. 741-8.
169. **Nauck MA, Niedereichholz U, Ettler R, Holst JJ, Orskov C, Ritzel R, Schmiegel WH.** Glucagon-like peptide 1 inhibition of gastric emptying outweighs its insulinotropic effects in healthy humans. *Am J Physiol*. Nov 1997, Bd. 273, (5 Pt 1), S. E981-8.
170. **Wettergren A, Wøjdemann M, Meisner S, Stadil F, Holst JJ.** The inhibitory effect of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) 7-36 amide on gastric acid secretion in humans depends on an intact vagal innervation. *Gut*. May 1997, Bd. 40, 5, S. 597-601.
171. **Schirra J, Houck P, Wank U, Arnold R, Göke B, Katschinski M.** Effects of glucagon-like peptide-1(7-36)amide on antro-pyloro-duodenal motility in the interdigestive state and with duodenal lipid perfusion in humans. *Gut*. May 2000, Bd. 46, 5, S. 622-31.
172. **Turton MD, O'Shea D, Gunn I, Beak SA, Edwards CM, Meeran K, Choi SJ, Taylor GM, Heath MM, Lambert PD, Wilding JP, Smith DM, Ghatei MA, Herbert J, Bloom SR.** A role for glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding. *Nature*. Jan 1996, Bd. 379, 6560, S. 69-72.
173. **Holst JJ.** Treatment of type 2 diabetes mellitus with agonists of the GLP-1 receptor or DPP-IV inhibitors. *Expert Opin Emerg Drugs*. May 2004, Bd. 9, 1, S. 155-66.
174. **Harris KB, McCarty DJ.** Efficacy and tolerability of glucagon-like peptide-1 receptor agonists in patients with type 2 diabetes mellitus. *Ther Adv Endocrinol Metab*. Feb 2015, Bd. 6, 1, S. 3-18.

175. **Wu D, Li L, Liu C.** Efficacy and safety of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors and metformin as initial combination therapy and as monotherapy in patients with type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis. *Diabetes Obes Metab.* Jan 2014, Bd. 16, 1, S. 30-7.
176. **Prasad-Reddy L, Isaacs D.** A clinical review of GLP-1 receptor agonists: efficacy and safety in diabetes and beyond. *Drugs Context.* Jul 2015, Bd. 4, 212283, S. 1-19.
177. **Mundil D, Cameron-Vendrig A, Husain M.** GLP-1 receptor agonists: a clinical perspective on cardiovascular effects. *Diab Vasc Dis Res.* Apr 2012, Bd. 9, 2, S. 95-108.
178. **Eng J, Kleinman WA, Singh L, Singh G, Raufman JP.** Isolation and characterization of exendin-4, an exendin-3 analogue, from *Heloderma suspectum* venom. Further evidence for an exendin receptor on dispersed acini from guinea pig pancreas. *J Biol Chem.* Apr 1992, Bd. 267, 11, S. 7402-5.
179. **Röhrborn D, Wronkowitz N, Eckel J.** DPP4 in Diabetes. *Front Immunol.* Jul 2015, Bd. 6, 386, S. 1-20.
180. **DeFronzo RA, Okerson T, Viswanathan P, Guan X, Holcombe JH, MacConell L.** Effects of exenatide versus sitagliptin on postprandial glucose, insulin and glucagon secretion, gastric emptying, and caloric intake: a randomized, cross-over study. *Curr Med Res Opin.* Oct 2008, Bd. 24, 10, S. 2943-52.
181. **Triplitt C, Solis-Herrera C.** GLP-1 Receptor Agonists: Practical Considerations for Clinical Practice. *Diabetes Educ.* Dec 2015, Bd. 41, (1 Suppl), S. 32S-46S.
182. **Ding L, Zhang J.** Glucagon-like peptide-1 activates endothelial nitric oxide synthase in human umbilical vein endothelial cells. *Acta Pharmacol Sin.* Jan 2012, Bd. 33, 1, S. 75-81.
183. **Okerson T, Chilton RJ.** The cardiovascular effects of GLP-1 receptor agonists. *Cardiovasc Ther.* Jun 2012, Bd. 30, 3, S. e146-55.
184. **Buse JB, Drucker DJ, Taylor KL, Kim T, Walsh B, Hu H, Wilhelm K, Trautmann M, Shen LZ, Porter LE, DURATION-1 Study Group.** DURATION-1: exenatide once weekly produces sustained glycemic control and weight loss over 52 weeks. *Diabetes Care.* Jun 2010, Bd. 33, 6, S. 1255-61.
185. **Nauck M, Frid A, Hermansen K, Shah NS, Tankova T, Mitha IH, Zdravkovic M, Düring M, Matthews DR, LEAD-2 Study Group.** Efficacy and safety comparison of liraglutide, glimepiride, and placebo, all in combination with metformin, in type 2 diabetes: the LEAD (liraglutide effect and action in diabetes)-2 study. *Diabetes Care.* Jan 2009, Bd. 32, 1, S. 84-90.
186. **Hsu TM, Hahn JD, Konanur VR, Lam A, Kanoski SE.** Hippocampal GLP-1 receptors influence food intake, meal size, and effort-based responding for food through volume transmission. *Neuropsychopharmacology.* Jan 2015, Bd. 40, 2, S. 327-37.

187. **Dailey MJ, Moran TH.** Glucagon-like peptide 1 and appetite. *Trends Endocrinol Metab.* Feb 2013, Bd. 24, 2, S. 85-91.
188. **Kreymann B, Williams G, Ghatel MA, Bloom SR.** Glucagon-like peptide-1 7-36: a physiological incretin in man. *Lancet.* Dec 1987, Bd. 2, 8571, S. 1300-4.
189. **Jendle J, Nauck MA, Matthews DR, Frid A, Hermansen K, Düring M, Zdravkovic M, Strauss BJ, Garber AJ, LEAD-2 and LEAD-3 Study Groups.** Weight loss with liraglutide, a once-daily human glucagon-like peptide-1 analogue for type 2 diabetes treatment as monotherapy or added to metformin, is primarily as a result of a reduction in fat tissue. *Diabetes Obes Metab.* Dec 2009, Bd. 11, 12, S. 1163-72.
190. **Okerson T, Yan P, Stonehouse A, Brodows R.** Effects of exenatide on systolic blood pressure in subjects with type 2 diabetes. *Am J Hypertens.* Mar 2010, Bd. 23, 3, S. 334-9.
191. **Crajoinas RO, Oricchio FT, Pessoa TD, Pacheco BP, Lessa LM, Malnic G, Girardi AC.** Mechanisms mediating the diuretic and natriuretic actions of the incretin hormone glucagon-like peptide-1. *Am J Physiol Renal Physiol.* Aug 2011, Bd. 301, 2, S. F355-63.
192. **Gutzwiller JP, Tschopp S, Bock A, Zehnder CE, Huber AR, Kreyenbuehl M, Gutmann H, Drewe J, Henzen C, Goeke B, Beglinger C.** Glucagon-like peptide 1 induces natriuresis in healthy subjects and in insulin-resistant obese men. *J Clin Endocrinol Metab.* Jun 2004, Bd. 89, 6, S. 3055-61.
193. **Ban K, Noyan-Ashraf MH, Hoefer J, Bolz SS, Drucker DJ, Husain M.** Cardioprotective and vasodilatory actions of glucagon-like peptide 1 receptor are mediated through both glucagon-like peptide 1 receptor-dependent and -independent pathways. *Circulation.* May 2008, Bd. 117, 18, S. 2340-50.
194. **Klonoff DC, Buse JB, Nielsen LL, Guan X, Bowlus CL, Holcombe JH, Wintle ME, Maggs DG.** Exenatide effects on diabetes, obesity, cardiovascular risk factors and hepatic biomarkers in patients with type 2 diabetes treated for at least 3 years. *Curr Med Res Opin.* Jan 2008, Bd. 24, 1, S. 275-86.
195. **Plutzky J, Garber A, Falahati A, Toft AD, Poulter NR.** Reductions in lipids and CV risk markers in patients with type 2 diabetes treated with liraglutide: a meta-analysis. *Can J Diabetes.* 2009, Bd. 33, 3, S. 209-10.
196. **Mells JE, Fu PP, Sharma S, Olson D, Cheng L, Handy JA, Saxena NK, Sorescu D, Anania FA.** Glp-1 analog, liraglutide, ameliorates hepatic steatosis and cardiac hypertrophy in C57BL/6J mice fed a Western diet. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* Jan 2012, Bd. 302, 2, S. G225-35.
197. **Davidson MH.** Cardiovascular effects of glucagonlike peptide-1 agonists. *Am J Cardiol.* Aug 2011, Bd. 108, (3 Suppl), S. 33B-41B.

198. **Bhashyam S, Fields AV, Patterson B, Testani JM, Chen L, Shen YT, Shannon RP.** Glucagon-like peptide-1 increases myocardial glucose uptake via p38alpha MAP kinase-mediated, nitric oxide-dependent mechanisms in conscious dogs with dilated cardiomyopathy. *Circ Heart Fail.* Jul 2010, Bd. 3, 4, S. 512-21.
199. **Bose AK, Mocanu MM, Carr RD, Brand CL, Yellon DM.** Glucagon-like peptide 1 can directly protect the heart against ischemia/reperfusion injury. *Diabetes.* Jan 2005, Bd. 54, 1, S. 146-51.
200. **Ravassa S, Zudaire A, Carr RD, Díez J.** Antiapoptotic effects of GLP-1 in murine HL-1 cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* Apr 2011, Bd. 300, 4, S. H1361-72.
201. **Ross R.** Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med.* Jan 1999, Bd. 340, 2, S. 115-26.
202. **Cybulsky MI, Gimbrone MA Jr.** Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science.* Feb 1991, Bd. 251, 4995, S. 788-91.
203. **Johnson RC, Chapman SM, Dong ZM, Ordovas JM, Mayadas TN, Herz J, Hynes RO, Schaefer EJ, Wagner DD.** Absence of P-selectin delays fatty streak formation in mice. *J Clin Invest.* Mar 1997, Bd. 99, 5, S. 1037-43.
204. **Cybulsky MI, Iiyama K, Li H, Zhu S, Chen M, Iiyama M, Davis V, Gutierrez-Ramos JC, Connelly PW, Milstone DS.** A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. *J Clin Invest.* May 2001, Bd. 107, 10, S. 1255-62.
205. **Gu L, Okada Y, Clinton SK, Gerard C, Sukhova GK, Libby P, Rollins BJ.** Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol Cell.* Aug 1998, Bd. 2, 2, S. 275-81.
206. **Saha P, Modarai B, Humphries J, Mattock K, Waltham M, Burnand KG, Smith A.** The monocyte/macrophage as a therapeutic target in atherosclerosis. *Curr Opin Pharmacol.* Apr 2009, Bd. 9, 2, S. 109-18.
207. **Ip JH, Fuster V, Badimon L, Badimon J, Taubman MB, Chesebro JH.** Syndromes of accelerated atherosclerosis: role of vascular injury and smooth muscle cell proliferation. *J Am Coll Cardiol.* Jun 1990, Bd. 15, 7, S. 1667-87.
208. **Heusch G, Libby P, Gersh B, Yellon D, Böhm M, Lopaschuk G, Opie L.** Cardiovascular remodelling in coronary artery disease and heart failure. *Lancet.* May 2014, Bd. 383, 9932, S. 1933-43.

209. **Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK, Blaha MJ, Cushman M, de Ferranti S, Després JP, Fullerton HJ, Howard VJ, Huffman MD, Judd SE, Kissela BM, Lackland DT, Lichtman JH, Lisabeth LD, Liu S, Mackey RH, Matchar DB, McGuire DK, Mohler ER 3rd, et al.** Heart disease and stroke statistics--2015 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. Jan 2015, Bd. 131, 4, S. e29-322.
210. **Arakawa M, Mita T, Azuma K, Ebato C, Goto H, Nomiya T, Fujitani Y, Hirose T, Kawamori R, Watada H.** Inhibition of monocyte adhesion to endothelial cells and attenuation of atherosclerotic lesion by a glucagon-like peptide-1 receptor agonist, exendin-4. *Diabetes*. Apr 2010, Bd. 59, 4, S. 1030-7.
211. **Nagashima M, Watanabe T, Terasaki M, Tomoyasu M, Nohtomi K, Kim-Kaneyama J, Miyazaki A, Hirano T.** Native incretins prevent the development of atherosclerotic lesions in apolipoprotein E knockout mice. *Diabetologia*. Oct 2011, Bd. 54, 10, S. 2649-59.
212. **Shiraki A, Oyama J, Komoda H, Asaka M, Komatsu A, Sakuma M, Kodama K, Sakamoto Y, Kotooka N, Hirase T, Node K.** The glucagon-like peptide 1 analog liraglutide reduces TNF- α -induced oxidative stress and inflammation in endothelial cells. *Atherosclerosis*. Apr 2012, Bd. 221, 2, S. 375-82.
213. **Dai Y, Mehta JL, Chen M.** Glucagon-like peptide-1 receptor agonist liraglutide inhibits endothelin-1 in endothelial cell by repressing nuclear factor-kappa B activation. *Cardiovasc Drugs Ther*. Oct 2013, Bd. 27, 5, S. 371-80.
214. **Galié N, Manes A, Branzi A.** The endothelin system in pulmonary arterial hypertension. *Cardiovasc Res*. Feb 2004, Bd. 61, 2, S. 227-37.
215. **Hirata Y, Kurobe H, Nishio C, Tanaka K, Fukuda D, Uematsu E, Nishimoto S, Soeki T, Harada N, Sakaue H, Kitagawa T, Shimabukuro M, Nakaya Y, Sata M.** Exendin-4, a glucagon-like peptide-1 receptor agonist, attenuates neointimal hyperplasia after vascular injury. *Eur J Pharmacol*. Jan 2013, Bd. 699, (1-3), S. 106-11.
216. **Terawaki Y, Nomiya T, Kawanami T, Hamaguchi Y, Takahashi H, Tanaka T, Murase K, Nagaishi R, Tanabe M, Yanase T.** Dipeptidyl peptidase-4 inhibitor linagliptin attenuates neointima formation after vascular injury. *Cardiovasc Diabetol*. Nov 2014, Bd. 13, 154.
217. **Li Y, Duffy KB, Ottinger MA, Ray B, Bailey JA, Holloway HW, Tweedie D, Perry T, Mattson MP, Kapogiannis D, Sambamurti K, Lahiri DK, Greig NH.** GLP-1 receptor stimulation reduces amyloid-beta peptide accumulation and cytotoxicity in cellular and animal models of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2010, Bd. 19, 4, S. 1205-19.

218. **During MJ, Cao L, Zuzga DS, Francis JS, Fitzsimons HL, Jiao X, Bland RJ, Klugmann M, Banks WA, Drucker DJ, Haile CN.** Glucagon-like peptide-1 receptor is involved in learning and neuroprotection. *Nat Med.* Sep 2003, Bd. 9, 9, S. 1173-9.
219. **Perry T, Haughey NJ, Mattson MP, Egan JM, Greig NH.** Protection and reversal of excitotoxic neuronal damage by glucagon-like peptide-1 and exendin-4. *J Pharmacol Exp Ther.* Sep 2002, Bd. 302, 3, S. 881-8.
220. **Larsen PJ, Tang-Christensen M, Jessop DS.** Central administration of glucagon-like peptide-1 activates hypothalamic neuroendocrine neurons in the rat. *Endocrinology.* Oct 1997, Bd. 138, 10, S. 4445-55.
221. **Ryan D, Acosta A.** GLP-1 receptor agonists: Nonglycemic clinical effects in weight loss and beyond. *Obesity (Silver Spring).* Jun 2015, Bd. 23, 6, S. 1119-29.
222. **Mayo KE, Miller LJ, Bataille D, Dalle S, Göke B, Thorens B, Drucker DJ.** International Union of Pharmacology. XXXV. The glucagon receptor family. *Pharmacol Rev.* Mar 2003, Bd. 55, 1, S. 167-94.
223. **Stoffel M, Espinosa R 3rd, Le Beau MM, Bell GI.** Human glucagon-like peptide-1 receptor gene. Localization to chromosome band 6p21 by fluorescence in situ hybridization and linkage of a highly polymorphic simple tandem repeat DNA polymorphism to other markers on chromosome 6. *Diabetes.* Aug 1993, Bd. 42, 8, S. 1215-8.
224. **Sandhu H, Wiesenthal SR, MacDonald PE, McCall RH, Tchipashvili V, Rashid S, Satkunarajah M, Irwin DM, Shi ZQ, Brubaker PL, Wheeler MB, Vranic M, Efendic S, Giacca A.** Glucagon-like peptide 1 increases insulin sensitivity in depancreatized dogs. *Diabetes.* May 1999, Bd. 48, 5, S. 1045-53.
225. **Montrose-Rafizadeh C, Avdonin P, Garant MJ, Rodgers BD, Kole S, Yang H, Levine MA, Schwindinger W, Bernier M.** Pancreatic glucagon-like peptide-1 receptor couples to multiple G proteins and activates mitogen-activated protein kinase pathways in Chinese hamster ovary cells. *Endocrinology.* Mar 1999, Bd. 140, 3, S. 1132-40.
226. **Hällbrink M, Holmqvist T, Olsson M, Ostenson CG, Efendic S, Langel U.** Different domains in the third intracellular loop of the GLP-1 receptor are responsible for Galpha(s) and Galpha(i)/Galpha(o) activation. *Biochim Biophys Acta.* Mar 2001, Bd. 1546, 1, S. 79-86.
227. **Liu L, Liu J, Wong WT, Tian XY, Lau CW, Wang YX, Xu G, Pu Y, Zhu Z, Xu A, Lam KS, Chen ZY, Ng CF, Yao X, Huang Y.** Dipeptidyl peptidase 4 inhibitor sitagliptin protects endothelial function in hypertension through a glucagon-like peptide 1-dependent mechanism. *Hypertension.* Sep 2012, Bd. 60, 3, S. 833-41.

228. **Zhong J, Rao X, Rajagopalan S.** An emerging role of dipeptidyl peptidase 4 (DPP4) beyond glucose control: potential implications in cardiovascular disease. *Atherosclerosis*. Feb 2013, Bd. 226, 2, S. 305-14.
229. **O'Callaghan DS, Savale L, Jaïs X, Natali D, Montani D, Humbert M, Simonneau G, Sitbon O.** Evidence for the use of combination targeted therapeutic approaches for the management of pulmonary arterial hypertension. *Respir Med*. Jul 2010, Bd. 104, (1 Suppl), S. S74-80.
230. **Goto H, Nomiya T, Mita T, Yasunari E, Azuma K, Komiya K, Arakawa M, Jin WL, Kanazawa A, Kawamori R, Fujitani Y, Hirose T, Watada H.** Exendin-4, a glucagon-like peptide-1 receptor agonist, reduces intimal thickening after vascular injury. *Biochem Biophys Res Commun*. Feb 2011, Bd. 405, 1, S. 79-84.
231. **Dahal BK, Kosanovic D, Pamarthi PK, Sydykov A, Lai YJ, Kast R, Schirok H, Stasch JP, Ghofrani HA, Weissmann N, Grimminger F, Seeger W, Schermuly RT.** Therapeutic efficacy of azaindole-1 in experimental pulmonary hypertension. *Eur Respir J*. Oct 2010, Bd. 36, 4, S. 808-18.
232. **Wei Y, Mojsov S.** Tissue-specific expression of the human receptor for glucagon-like peptide-I: brain, heart and pancreatic forms have the same deduced amino acid sequences. *FEBS Lett*. Jan 1995, Bd. 358, 3, S. 219-24.
233. **Underwood RA, Gibran NS, Muffley LA, Usui ML, Olerud JE.** Color subtractive-computer-assisted image analysis for quantification of cutaneous nerves in a diabetic mouse model. *J Histochem Cytochem*. Oct 2001, Bd. 49, 10, S. 1285-91.
234. **Perros F, Montani D, Dorfmueller P, Durand-Gasselin I, Tcherakian C, Le Pavec J, Mazmanian M, Fadel E, Mussot S, Mercier O, Hervé P, Emilie D, Eddahibi S, Simonneau G, Souza R, Humbert M.** Platelet-derived growth factor expression and function in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. Jul 2008, Bd. 178, 1, S. 81-8.
235. **Voelkel NF, Gomez-Arroyo J, Abbate A, Bogaard HJ, Nicolls MR.** Pathobiology of pulmonary arterial hypertension and right ventricular failure. *Eur Respir J*. Dec 2012, Bd. 40, 6, S. 1555-65.
236. **Summer R, Walsh K, Medoff BD.** Obesity and pulmonary arterial hypertension: Is adiponectin the molecular link between these conditions? *Pulm Circ*. Oct-Dec 2011, Bd. 1, 4, S. 440-7.
237. **Bogaard HJ, Al Hussein A, Farkas L, Farkas D, Gomez-Arroyo J, Abbate A, Voelkel NF.** Severe pulmonary hypertension: The role of metabolic and endocrine disorders. *Pulm Circ*. Apr-Jun 2012, Bd. 2, 2, S. 148-54.
238. **Rabinovitch M.** Molecular pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *J Clin Invest*. Dec 2012, Bd. 122, 12, S. 4306-13.

239. **Mita T, Watada H.** Glucagon like Peptide-1 and atherosclerosis. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem.* Dec 2012, Bd. 10, 4, S. 309-18.
240. **Ussher JR, Drucker DJ.** Cardiovascular biology of the incretin system. *Endocr Rev.* Apr 2012, Bd. 33, 2, S. 187-215.
241. **Channick RN, Sitbon O, Barst RJ, Manes A, Rubin LJ.** Endothelin receptor antagonists in pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol.* Jun 2004, Bd. 43, (12 Suppl S), S. 62S-67S.
242. **Bauer V, Sotníková R.** Nitric oxide--the endothelium-derived relaxing factor and its role in endothelial functions. *Gen Physiol Biophys.* Dec 2010, Bd. 29, 4, S. 319-40.
243. **Montani D, Chaumais MC, Savale L, Natali D, Price LC, Jaïs X, Humbert M, Simonneau G, Sitbon O.** Phosphodiesterase type 5 inhibitors in pulmonary arterial hypertension. *Adv Ther.* Sep 2009, Bd. 26, 9, S. 813-25.
244. **Ghofrani HA, Hoeper MM, Halank M, Meyer FJ, Staehler G, Behr J, Ewert R, Weimann G, Grimminger F.** Riociguat for chronic thromboembolic pulmonary hypertension and pulmonary arterial hypertension: a phase II study. *Eur Respir J.* Oct 2010, Bd. 36, 4, S. 792-9.
245. **Giaid A, Saleh D.** Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med.* Jul 1995, Bd. 333, 4, S. 214-21.
246. **Yang Z, Ming XF.** Recent advances in understanding endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Clin Med Res.* Mar 2006, Bd. 4, 1, S. 53-65.
247. **Körner M, Christ E, Wild D, Reubi JC.** Glucagon-like peptide-1 receptor overexpression in cancer and its impact on clinical applications. *Front Endocrinol (Lausanne).* Dec 2012, Bd. 3, 158, S. 1-7.
248. **Ryan JJ, Archer SL.** The right ventricle in pulmonary arterial hypertension: disorders of metabolism, angiogenesis and adrenergic signaling in right ventricular failure. *Circ Res.* Jun 2014, Bd. 115, 1, S. 176-88.
249. **Bogaard HJ, Abe K, Vonk Noordegraaf A, Voelkel NF.** The right ventricle under pressure: cellular and molecular mechanisms of right-heart failure in pulmonary hypertension. *Chest.* Mar 2009, Bd. 135, 3, S. 794-804.
250. **Bogaard HJ, Natarajan R, Henderson SC, Long CS, Kraskauskas D, Smithson L, Ockaili R, McCord JM, Voelkel NF.** Chronic pulmonary artery pressure elevation is insufficient to explain right heart failure. *Circulation.* Nov 2009, Bd. 120, 20, S. 1951-60.

251. **Noyan-Ashraf MH, Momen MA, Ban K, Sadi AM, Zhou YQ, Riazi AM, Baggio LL, Henkelman RM, Husain M, Drucker DJ.** GLP-1R agonist liraglutide activates cytoprotective pathways and improves outcomes after experimental myocardial infarction in mice. *Diabetes*. Apr 2009, Bd. 58, 4, S. 975-83.
252. **Sokos GG, Nikolaidis LA, Mankad S, Elahi D, Shannon RP.** Glucagon-like peptide-1 infusion improves left ventricular ejection fraction and functional status in patients with chronic heart failure. *J Card Fail*. Dec 2006, Bd. 12, 9, S. 694-9.
253. **Nauck M.** Incretin therapies: highlighting common features and differences in the modes of action of glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors. *Diabetes Obes Metab*. 18, Mar 2016, Bd. 3, S. 203-16.
254. **Morales J.** The pharmacologic basis for clinical differences among GLP-1 receptor agonists and DPP-4 inhibitors. *Postgrad Med*. Nov 2011, Bd. 123, 6, S. 189-201.
255. **Sportiello L, Rafaniello C, Scavone C, Vitale C, Rossi F, Capuano A.** The importance of Pharmacovigilance for the drug safety: Focus on cardiovascular profile of incretin-based therapy. *Int J Cardiol*. Jan 2016, Bd. 202, S. 731-5.
256. **Roessner A, Pfeifer U, Müller-Hermelink HK [Hrsg].** *Grundmann: Allgemeine Pathologie und Grundlagen der speziellen Pathologie*. München : Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag, 2008. 11. Auflage. ISBN 978-3-437-41541-8.
257. **Ghofrani HA, Grimminger F.** Modulating cGMP to treat lung diseases. *Handb Exp Pharmacol*. 2009, Bd. 191, S. 469-83.

9 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1:	Funktionelle Anatomie der Lunge: Alveoläres Kompartiment	04
Abbildung 2:	Stark vereinfachtes Schema des kardiovaskulären Systems	06
Abbildung 3:	Schematische Darstellung des Aufbaus einer Arterie	07
Abbildung 4:	Pathophysiologie der PH	17
Abbildung 5:	Pharmakotherapie der PH	23
Abbildung 6:	Biologisches Wirkspektrum von GLP-1	27
Abbildung 7:	Konsequenzen chronischer Hyperglykämie für die vaskuläre Integrität	30
Abbildung 8:	Anti-arteriosklerotisches Wirkpotenzial von GLP-1	33
Abbildung 9:	GLP-1R vermittelte Relaxation glatter Muskelzellen	35
Abbildung 10:	Immunhistochemische Lokalisation von GLP-1R	55
Abbildung 11:	Vergleich des Expressionsprofils von GLP-1R auf pulmonalvaskulären Strukturen der humanen Lunge zwischen gesunden Lungen (Donor) und IPAH-Lungen	56
Abbildung 12:	Vergleich des Expressionsprofils von GLP-1R auf pulmonalvaskulären Strukturen der humanen Lunge zwischen gesunden Lungen (Donor) und CTEPH-Lungen	57
Abbildung 13:	Vergleich des Expressionsprofils von GLP-1R auf pulmonalvaskulären Strukturen der Rattenlunge zwischen gesunden Lungen (<i>Healthy control</i>) und MCT-Lungen	58
Abbildung 14:	Vergleich des Expressionsprofils von GLP-1 auf pulmonalvaskulären Strukturen der humanen Lunge zwischen gesunden Lungen (Donor) und IPAH-Lungen	59
Abbildung 15:	Vergleich des Expressionsprofils von GLP-1 auf pulmonalvaskulären Strukturen der humanen Lunge zwischen gesunden Lungen (Donor) und CTEPH-Lungen	60
Abbildung 16:	Vergleich des Expressionsprofils von GLP-1 auf pulmonalvaskulären Strukturen der Rattenlunge zwischen gesunden Lungen (<i>Healthy control</i>) und MCT-Lungen	61
Abbildung 17:	Anti-proliferativer Effekt von Exendin-4 auf die durch FCS induzierte Proliferation aus MCT-Ratten isolierter PASMCs	63
Abbildung 18:	Schematische Darstellung der immunhistochemischen Reaktion	75
Abbildung 19:	Exemplarische Darstellung der <i>scoring analysis</i>	76

Für jegliche aus Fremdquellen stammenden Abbildungen (deren Reproduktion, Modifikation und/oder Zuhilfenahme für die Erstellung eigener Schemata) wurde die Nutzungsgenehmigung des Autors/der Autoren bzw. des jeweiligen Verlages eingeholt.

10 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1:	Funktionelle Klassifikation der PH	11
Tabelle 2:	Aktuelle klinische Klassifikation der PH (Nizza, 2013)	12
Tabelle 3:	Speziell kardioprotektive Wirkungen von GLP-1	31
Tabelle 4:	Verwendete Puffer, Medien und Lösungen	41
Tabelle 5:	Probenmaterial für die immunhistochemische Untersuchung	44
Tabelle 6:	Färbeprotokolle der konventionellen histologischen Färbungen	46
Tabelle 7:	Färbeprotokoll der GLP-1R und GLP-1 Immunhistochemie auf Humangewebe	48
Tabelle 8:	Färbeprotokoll der GLP-1R und GLP-1 Immunhistochemie auf Rattengewebe	49
Tabelle 9:	Färbeprotokoll der immunhistochemischen Doppelfärbung: α -Actin und vWF	50
Tabelle 10:	Protokoll des Zellkultur-Experiments	52

11 DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich die Gelegenheit ergreifen und mich bei all jenen bedanken, die mich auf meinem langen Weg begleitet und so auf verschiedenste Art und Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Mein besonderer Dank gilt ...

... Herrn Prof. Dr. Ralph Theo Schermuly für die Bereitstellung des äußerst interessanten Themas sowie die vielen anregenden Gespräche in gemütlicher Atmosphäre,

... Herrn Prof. Dr. Norbert Weissmann für die Zweitbetreuung dieser Arbeit,

... Herrn Prof. Dr. Robert Voswinckel für die Anfertigung des Zweitgutachtens sowie Herrn Prof. Dr. Volker Roelcke und Herrn Prof. Dr. Christian Tanislav für die Bewertung meiner Disputation,

... Herrn Dr. Djuro Kosanovic für die exzellente wissenschaftliche Betreuung, seine konstruktiven Ratschläge sowie seine allzeit freundschaftliche Unterstützung,

... Frau Ewa Bieniek für ihre nicht hoch genug zu schätzende Kompetenz insbesondere auf dem Gebiet der Immunhistochemie,

... Herrn Aleksandar Petrovic und Herrn Oleg Pak für die Unterstützung bei der Durchführung des Zellkultur-Experiments,

... der gesamten Arbeitsgruppe Schermuly für die überaus kollegiale und freundliche Arbeitsatmosphäre.

Mein größter Dank gilt jedoch meiner Familie und meinem Freundeskreis für die immerwährende Unterstützung sowie für deren unerschöpfliche Geduld insbesondere in schwierigen Tagen.

Danke.

12 LEBENSLAUF

Der Lebenslauf wurde sowohl aus der Druckversion der Dissertation als auch aus der elektronischen Version entfernt.

13 EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich,

dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht.

Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt.

Ich versichere,

dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert.

Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt.

Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht.

Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.

*Gießen, den 12.01.2017
Maximilian Hertl*